

Die Auswirkung physikalischen Stresses auf monoklonale Antikörper in der Formulierungsentwicklung

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Annette Eppler
aus Tübingen

1. Referentin:	Professorin Dr. Heike Bunjes
2. Referentin oder Referent:	Professorin Dr. Christel Müller-Goymann
eingereicht am:	20.07.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09.01.2012
Druckjahr	2012

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Eppler, A., Weigandt, M., Hanefeld, A., Bunjes, H.
Relevant shaking stress conditions for antibody preformulation development.
Eur. J. Pharm. Biopharm. 74: 139-174 (2010).

Eppler, A., Weigandt, M., Schulze, S., Hanefeld, A., Bunjes, H.
Comparison of different protein concentration techniques within preformulation development
Int. J. Pharm. 421: (1) 120-129 (2011).

Tagungsbeiträge

Eppler, A., Weigandt, M., Hanefeld, A., Bunjes, H.: Relevant shaking stress conditions for antibody preformulation development: A discriminatory condition.
(Poster), DPhG-Doktorandentagung; Pichlarn; Österreich (2009)

Eppler, A., Weigandt, M., Hanefeld, A., Bunjes, H.: Stress conditions in protein formulation development: A comparison of two antibody solutions in different containers during shaking.
(Poster), Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Braunschweig, Deutschland (2008)

Eppler, A., Weigandt, M., Hanefeld, A., Bunjes, H.: Analysis of stress conditions in protein formulation development: Influence of different filling volumes and shaking intensities in a 6 ml vial. (Poster), 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (APV), Barcelona, Spanien (2008)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Prof. Heike Bunjes während meiner Promotionszeit bei Merck Serono in Darmstadt. Frau Prof. Heike Bunjes, danke ich für ihre Unterstützung, ihre guten Ideen, ihre sehr konstruktive Diskussionsbereitschaft und für ihr Vertrauen in meine Person.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Müller-Goymann für die Übernahme des Koreferats und Prof. Dr. Beerhues für den Vorsitz der Promotionskommission.

Für die Möglichkeit zur Promotion in einem Industrieumfeld und die finanzielle Unterstützung möchte ich ganz herzlich Merck Serono, insbesondere Dr. Markus Weigandt und Dr. Andrea Hanefeld danken. Als meine Betreuer waren sie stets bereit mit mir meine Ergebnisse zu hinterfragen, neue Ideen zu entwickeln und zu diskutieren sowie neue Wege einzuschlagen.

Außerdem möchte ich mich natürlich ganz herzlich bei der kompletten Abteilung Exploratory Development bedanken. Mein Dank gilt hierbei besonders meinen direkten Kollegen in dem ED2/ED4 Labor, die mich in manch schwerer Stunde tatkräftig im Labor wie auch durch guten Zuspruch unterstützten: Katrin Grieser, Hiltrud Molodych, Jörg Plaschke, Susanne Overdiek, Anne Meier, Senta Uezguen und Sandra Schulze.

Weiterhin möchte ich mich natürlich bei meinen Mit-Doktoranden bedanken, ohne die diese Arbeit mir sicherlich nicht so viel Spaß gemacht hätte und ich auch die eine oder andere Idee nicht gehabt hätte: Katrin Ziegler, Thomas Lange, Marc Hugo, Simon Geißler, Stefan Hindel, Katharina Anhalt, Cornelia Zumpe und Maria Leonor Alvarenga. Ich danke ihnen für ihre Unterstützung in jeglicher Lage.

Einen großen Dank möchte ich auch meinen Praktikanten Silke Simon, Sebastian Schmidt und Jana Renke aussprechen, die wichtige Arbeiten für diese Dissertation leisteten. Das Zusammenarbeiten mit ihnen bereitete mir sehr viel Freude.

Außerdem möchte ich dem Aerodynamischen Institut der RWTH Aachen danken, dass ich dort die Möglichkeit und Hilfe zur Berechnung meiner aerodynamischen Simulationen bekam. Prof. Dr. W. Schröder, Dr. Ronald Abstiens und Dr. Andreas Henze gilt hier mein besonderer Dank. Aber auch dem Rest der Arbeitsgruppe danke ich für die wirklich sehr freundliche Aufnahme ins Team.

Thomas Rysiok und seiner Arbeitsgruppe möchte ich ganz herzlich danken für die Unterstützung und Einführung in die Thematik des „Design of Experiments (Cornerstone)“. Ich bekam hier jederzeit Hilfe, wenn ich unlösbare Fragen hatte oder einen Diskussionspartner brauchte.

Ich danke selbstverständlich meinen Freunden die mich in Höhen und Tiefen meiner Arbeit unterstützten. Hier danke ich vor allem Caroline Hippenstiel, die mir auch in frustrierenden Phasen immer wieder Mut zusprach und mich mit ihrer fröhlichen Art wieder aufheiterte. Natürlich danke ich auch: Tatjana, Mirka, Steffi, Tobi D., Jo, Miri, Arnaud, Tobi W., Gesine, Kerstin, Sandra, Fredi und Franni für ihre Freundschaft und Unterstützung.

Meinem Freund Jochen möchte ich ganz besonders danken, er hat mich in jeglichen Lebenslagen während der Promotion begleitet und war stets mein Halt zu Hause. Auch verstand er es mich durch seine lustige Art auch in frustrierenden Phasen aufzumuntern.

Zu guter Letzt gebührt mein Dank meiner Familie: meinen Eltern Marianne Eppler und Dr. Arne Eppler und meinem Bruder Felix Eppler. Dank ihnen habe ich die angestrebten Ziele in meinem bisherigen Leben erreichen können. Sie waren Halt und Motivation. Sie unterstützen mich nicht nur finanziell, sondern auch durch ihren stetigen Zuspruch, ihre Liebe und ihr Vertrauen. Ich danke ihnen sehr dafür. Diese Arbeit ist aus diesem Grund meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1 Entwicklung monoklonaler Antikörper.....	3
2.1.1 Antikörperstruktur.....	3
2.1.2 Cetuximab	5
2.2 Instabilitäten von monoklonalen Antikörpern.....	7
2.2.1 Chemische Instabilitäten	7
2.2.2 Physikalische Instabilitäten	9
2.3 Formulierungen für monoklonale Antikörper	11
2.4 Analytische Methoden zur Detektion von Instabilitäten.....	14
2.4.1 Analyse der chemischen Instabilitäten	14
2.4.2 Analyse der physikalischen Instabilitäten	15
2.5 Stressarten	17
2.6 Aufkonzentrierung und Aufkonzentrierungstechniken	21
3. Material und Methoden	27
3.1 Materialien	27
3.1.1 Monoklonale IgG-Antikörper	27
3.1.2 Hilfsstoffe, Reagenzien, Chemikalien.....	27
3.1.3 Verpackungsmaterialien.....	27
3.2 Methoden.....	30
3.2.1 Herstellung der Proben.....	30

3.2.2 Stressmethoden.....	32
3.2.2.1 Schüttelstress	32
3.2.2.2 Rührstress	33
3.2.2.3 Luft-Wasser-Grenzflächenstress (LWG-Stress)	33
3.2.2.4 Wärmestress	34
3.2.3 Analytische Methoden.....	35
3.2.3.1 Visuelle Kontrolle	35
3.2.3.2 Trübungsmessung über Absorptions-Spektroskopie bei 350 nm.....	35
3.2.3.3 Konzentrationsmessung über Absorptions-Spektroskopie bei 280 nm.....	36
3.2.3.4 Lichtmikroskopie	37
3.2.3.5 Größenausschlusschromatographie	38
3.2.3.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
3.2.3.7 Isoelektrische Fokussierung	40
3.2.3.8 Lichtblockade (PAMAS).....	41
3.2.3.9 Oberflächenspannungsmessung	42
3.2.3.10 Viskositätsmessung	42
3.2.3.11 Dichtemessung	43
3.2.3.12 pH-Messung	43
3.2.4 CFD-Simulation	43
3.2.5 Hochgeschwindigkeitsbilder	46
3.2.6 Statistische Versuchsplanung.....	46
3.2.7 Aufkonzentrierungs-Studien	49
3.2.7.1 Dialyse.....	50
3.2.7.2 Zentrifugalkonzentratoren.....	50
3.2.7.3 Tangentialstromfiltration (TFF)	50
3.2.7.4 Rührzelle	51
4. Ergebnisse und Diskussion	52
4.1 Identifizierung geeigneter Stressbedingungen in der Präformulierung.....	52
4.1.1 Rührstress: Einfluss verschiedener Parameter auf die Stabilität eines monoklonalen Antikörpers.....	53
4.1.1.1 Rührgeschwindigkeit.....	53
4.1.1.2 Füllmenge innerhalb des Vials	55
4.1.1.3 Verstärkte Diskriminierung.....	57

4.1.1.4 Einfluss von Tween 80	58
4.1.1.5 Einfluss der Temperatur	60
4.1.1.6 Zusammenfassende Diskussion - Rührstress	62
4.1.2 Schüttelstress: Einfluss verschiedener Schüttel-Parameter auf die Stabilität eines monoklonalen Antikörpers	65
4.1.2.1 Füllmenge innerhalb der Vials	65
4.1.2.2 Vialgröße und Vialtyp/verschiedene Antikörper	68
4.1.2.3 Schüttelgeschwindigkeit.....	72
4.1.2.4 Diskriminierende Bedingung	73
4.1.2.5 Einfluss der Temperatur	77
4.1.2.6 Zusammenfassende Diskussion - Schüttelstress	80
4.1.2.7 Vergleich Rühren mit Schütteln	81
4.2. Untersuchungen zur Ursache für Instabilitäten während des mechanischen Stresses	84
4.2.1 Versuch der Erklärung der Schüttelstressergebnisse anhand einer CFD-Simulation	84
4.2.1.1 Problemstellung, Vorgehens- und Auswertungsweise der CFD-Simulation	84
4.2.1.2 Simulation von verschiedenen Schüttelintensitäten	89
4.2.1.3 Simulation von verschiedenen Füllmengen	92
4.2.1.4 Vergleich der Simulation mit der Realität anhand von Hochgeschwindigkeitsbildern	94
4.2.1.5 Zusammenfassende Diskussion.....	99
4.2.2 Erklärungsversuch der Schüttelstressergebnisse anhand zweier Stressmethoden: Scherstress und Luft-Wasser-Grenzflächenstress	101
4.2.2.1 Vergleich von Scherstress mit Luft-Wasser-Grenzflächenstress	101
4.2.2.2 Einfluss von Tween 80 auf den Antikörper während der verschiedenen Stressbedingungen.....	108
4.2.2.3 Zusammenfassende Diskussion.....	111
4.3 Arbeiten mit hochkonzentrierten Antikörperlösungen	115
4.3.1 Schüttelstressversuche mit hochkonzentrierten Antikörperlösungen	115
4.3.1.1 Vergleich von hochkonzentrierter Antikörperlösung mit gering konzentrierter Antikörperlösung.....	115
4.3.1.2 Schütteln von hochkonzentrierten Cetuximab-Lösungen bei verschiedenen Schüttelintensitäten	119
4.3.1.3 Zusammenfassende Diskussion.....	122
4.3.2 Statistische Versuchsplanung für verschiedene Konzentrationen beim Schütteln.....	124
4.3.2.1 Aufstellung eines Versuchsplans	124

4.3.2.2 Auswertung mit Hilfe von „Cornerstone®“	126
4.3.2.3 Zusammenfassende Diskussion.....	132
4.3.3. Aufkonzentrierungstechniken für hochkonzentrierte Antikörperlösungen im Vergleich	134
4.3.3.1 Verschiedene Membrantypen.....	134
4.3.3.2 Verschiedene Ausschlussgrenzen	137
4.3.3.3 Verschiedene Startkonzentrationen.....	139
4.3.3.4 Machbarkeits-Studie für verschiedene Aufkonzentrierungstechniken	143
4.3.3.5 Stabilitäts-Studie für verschiedene Aufkonzentrierungstechniken	146
4.3.3.6 Zusammenfassende Diskussion.....	152
5. Abschlussdiskussion	156
6. Zusammenfassung.....	162
Literaturverzeichnis.....	165
Anhang	179
A1 Trübungsmessungen an Formazin-Standardlösungen.....	179
A2 Lichtblockademessungen	180
A3 Simulation und Hochgeschwindigkeitsaufnahmen	182
A4 Anteil löslicher Aggregate (ausgewählte Ergebnisse).....	186
A5 Ausgewählte SDS-PAGE-Ergebnisse	188
A6 Ausgewählte Bilder der visuellen Kontrolle	189
A7 Statistische Versuchsplanung	191
A8 Vergleich von Aufkonzentrierungstechniken.....	192

Abkürzungen

Abs	Absorption
AK	Antikörper
Aqua pur.	Aqua purificata (gereinigtes Wasser)
AS	Aminosäure
Asp	Asperaginsäure
Asn	Asperagin
AUC	Area Under the Curve (Fläche unter der Kurve)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Circulardichroismus
CFD	Computational Fluid Dynamics
CMC	Critical Micelle Concentration (Kritische Mizellbildungskonzentration)
Cys	Cystein
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Dynamische Differenzkalorimetrie)
DTT	Dithiotreithol
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
Fab	Fragment Antigen Binding
Fc	Fragment Crystallisable
FTIR	Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
HC	Heavy Chain (Schwere Kette eines Antikörpers)
hGH	Human Growth Hormone (Wachstumshormon)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin
<i>i.m.</i>	intramuskulär
<i>i.v.</i>	intravenös
LC	Light Chain (Leichte Kette eines Antikörpers)

LAF-Bank	Laminar Air Flow box
Lsg.	Lösung
LWG	Luft-Wasser-Grenzfläche
LWG-Stress	Luft-Wasser-Grenzflächenstress
Met	Methionin
MFI	Micro-Flow-Imaging
nDSC	nano Differential Scanning Calorimetry (Dynamische Differenzkalorimetrie)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PES	Polyethersulfon
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia
Phe	Phenylalanin
pI	Isoelektrischer Punkt
Pos	Position
Pro	Prolin
RC	Regenerierte Zellulose
RT	Raumtemperatur
<i>s.c.</i>	subcutan
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
TGF- α	Transforming Growth Factor
TFF	Tangential Flow Filtration (Tangential-Strom-Filtration)
TMP	Trans-Membrane-Pressure (Trans-Membran-Druck)
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U/min	Umdrehungen pro Minute
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VOF	Volume of Fluid

1. Einleitung und Problemstellung

Der Beginn rekombinanter DNA-Technologie in den späten 70er Jahren war ein bedeutender Durchbruch in der Geschichte der Biotechnologie. Zuvor wurden Proteinarzneimittel ausgehend von biologischen Geweben oder Flüssigkeiten entwickelt. Es traten Unterschiede von Spezies zu Spezies auf, die sich in der Aminosäuresequenz äußerten. Mit der neuen rekombinanten DNA-Technologie hingegen konnte nun im Großmaßstab präzise die gewünschte Aminosäuresequenz durch gezielte Veränderung des DNA-Codes hergestellt werden [Patro et al. 2002]. Seit dieser Zeit haben viele rekombinante Proteine den Markt erreicht, darunter viele Antikörper. Diese sind sehr potente Arzneimittel und inzwischen aus der Therapie von z.B. Krebserkrankungen, Autoimmunkrankheiten und zur Prophylaxe von Transplantatabstoßungen nicht mehr wegzudenken.

Diese Antikörper zu entwickeln, stellt allerdings eine nicht ganz einfache Aufgabe dar. Antikörper sind, wie alle Proteinarzneimittel, sehr empfindlich gegenüber Stress. Da während der Herstellung, der Verpackung, der Lagerung, des Transportes und der Verabreichung unvermeidlich Stress auf die Antikörper ausgeübt wird, sollten sie gegen diesen durch eine entsprechende Formulierung weitgehend geschützt werden. Stress für ein Protein stellen z.B. Temperatur, Licht, Schütteln oder Rühren dar [Wang 1999]. Diese Stressfaktoren verursachen innerhalb des Proteins Instabilitäten, die man in chemische und physikalische auftrennen kann. Chemische Instabilitäten werden meist von Stressfaktoren wie Temperatur oder Licht ausgelöst und äußern sich in Deamidierungen, Hydrolysen oder Oxidationen [Parkins und Lashmar 2000]. Physikalische Instabilitäten werden vorzugsweise durch Stressarten wie Schütteln oder Rühren ausgelöst. Dieser Stress kann zu Aggregatbildung führen, welche ein großes Problem innerhalb von Antikörperlösungen darstellt, da bei einer *i.v.*, *s.c.* oder *i.m.* Gabe Aggregate immunogen wirken können [Schellekens 2005]. Aggregate bilden sich nach Kontakt mit hydrophoben Oberflächen, wie z.B. Luft-Wasser-Grenzflächen [Sluzky et al. 1992] oder anderen Oberflächen wie Plastik oder Glas. Auch Scherstress wird in der Literatur als Auslöser für Aggregation diskutiert [Oliva et al. 2003]. Die Bildung von Aggregaten kann irreversibel sein, oder aber auch reversibel, was bedeutet, dass sie sich in ihre Ausgangsform zurückbilden können [Liu et al. 2008a]. Anhand ihrer Größe unterteilt man Aggregate in löslich oder unlöslich. Es bedarf geeigneter Analysenmethoden, um alle Aggregatspezies zu detektieren. Meist reicht hierfür nicht nur eine Analysenmethode aus, sondern es ist eine Kombination mehrerer Methoden [Philo 2006] wie z.B. von

Größenausschlusschromatographie, Trübungsmessung mittels UV/VIS-Spektroskopie, Mikroskopie und SDS-PAGE erforderlich.

Um derartige Instabilitäten zu vermeiden, werden entsprechende Formulierungen entwickelt. Gegen physikalischen Stress wie das Schütteln oder Rühren sind vor allem Zusätze wie Tenside (z.B. Tween 80) sehr effektiv [Kerwin 2007]. Um den physikalischen Stress zu simulieren und in kürzester Zeit die beste Formulierung aus einer Vielzahl von Formulierungen auszuwählen, werden Stresstests wie Schütteln und Rühren unter definierten Versuchsbedingungen durchgeführt [Kiese et al. 2008]. Allerdings gibt es bisher keine Richtlinien, welche diese Bedingungen definieren. Aus diesem Grund wird Schüttelstress/ Rührstress von Labor zu Labor sehr unterschiedlich ausgeübt. Eine Information über die Relevanz und Vergleichbarkeit der Schüttelversuche existiert jedoch nicht. Deshalb ist die Beantwortung folgender Fragen Ziel dieser Arbeit:

- Welchen Einfluss hat die Variation unterschiedlicher Stressparameter auf die Stabilität einer Antikörperlösung?
- Ist die Entwicklung einer diskriminierenden Methode für Schüttelstress und Rührstress im Kleinmaßstab (aufgrund geringer Probemenge in der frühen Phase der Entwicklung) möglich, die es erleichtert, nicht ausreichend formulierte Lösungen mit stabilen Marktformulierungen zu vergleichen und eine geeignete Präformulierung mit Hilfe der Stressmethode frühzeitig auszuwählen?
- Welches sind die Ursachen für die Aggregatbildung durch physikalischen Stress wie Rühren oder Schütteln (Erklärungsansätze)?

Auch das Aufkonzentrieren von Antikörperlösungen stellt einen physikalischen Stress dar. Deshalb war ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit, verschiedene Aufkonzentrierungstechniken hinsichtlich der Qualität und Stabilität des konzentrierten Antikörpers zu vergleichen. Eine hochkonzentrierte Proteinlösung im Bereich von 100 mg/ml wird immer häufiger verlangt, da sie *i.m.* oder *s.c.* verabreicht werden kann, im Gegensatz zu der relativ aufwendigen *i.v.* Gabe von gering konzentrierten Antikörperlösungen [Daugherty und Mersny 2006]. In der frühen Phase der Entwicklung eines Antikörpers stehen nur geringe Mengen Protein zur Verfügung, so dass nicht dieselbe Aufkonzentrierungstechnik angewendet werden kann wie später in der Produktion. Dort wird meist die Tangentialstromfiltration (TFF) verwendet. Doch schon in der frühen Entwicklung sollten die Formulierungen ausgewählt werden, welche sich mit den geringsten Instabilitäten aufkonzentrieren lassen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Techniken, die im Kleinmaßstab einsetzbar sind, mit der TFF verglichen.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Entwicklung monoklonaler Antikörper

Im Jahre 1986 wurde der erste rekombinante monoklonale Antikörper Orthoclone[®] OKT3 von der FDA zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen bei Nieren-Transplantationen zugelassen. Ab diesem Zeitpunkt entwickelte sich der Markt der rekombinanten Antikörper-Therapien gegen eine Vielzahl von Krankheiten. Krebs, Autoimmunerkrankungen, aber auch kardiovaskuläre, respiratorische oder Infektionskrankheiten konnten durch die biologischen Wirkstoffe mit einem neuen Wirkprinzip behandelt werden [Pavlou und Belsey 2005]. Das Feld der durch biologische Antikörper behandelbaren Krankheiten ist noch längst nicht ausgeschöpft und stellt ein zukunftsträchtiges Gebiet der Forschung dar. Der Typ der eingesetzten monoklonalen Antikörper wechselt langsam von chimären zu humanisierten oder humanen, welche weniger immunogen wirken [Pavlou und Belsey 2005]. Während chimäre Antikörper noch den variablen Teil des Fab-Fragmentes der Maus besitzen (Abb. 2.1.1), haben humanisierte Antikörper nur noch 5% und humane Antikörper gar keinen Maus-Anteil mehr. Es ist inzwischen möglich, diese völlig humanen Antikörper in transgenen Mäusen oder nach humanen Datenbanken herzustellen [Brekke und Loset 2003; Penichet und Morrisso 2004]. Auch Kombinationen von monoklonalen Antikörpern mit Chemotherapeutika, Immunotoxinen oder Radioisotopen werden genutzt, um beispielsweise in einem Tumor gezielt ein Zytostatikum freizusetzen oder den synergistischen Effekt von Antikörper und Toxin auszunutzen [Martsev et al. 2004; Penichet und Morrisso 2004]. Durch den spezifischen Wirkmechanismus von monoklonalen Antikörpern können Nebenwirkungen vermindert werden. Das Prinzip der komplexen Herstellung monoklonaler Antikörper wurde 1975 von Köhler und Milstein erstmals publiziert, die dafür im Jahr 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten [Köhler und Milstein 1975]. Nach der Herstellung müssen Antikörperlösungen stabilisiert und formuliert werden. Diese Formulierung wird meist durch wässrige Lösungen oder Lyophilisate umgesetzt [Wang et al. 2007]. Lyophilisate werden dann verwendet, wenn das Protein in der Lösung so instabil ist, dass es trotz einer guten Formulierung nicht dem Stress standhält, der während des Transportes und der Lagerung auftritt.

2.1.1 Antikörperstruktur

Antikörper, die auch Immunglobuline genannt werden, sind Proteine aus der Klasse der Globuline. Sie gehören zum Immunsystem von Wirbeltieren und werden als Abwehr-

Reaktion gegen Antigene gebildet. Sie binden mit einem Schlüssel-Schloss-Prinzip das Antigen und markieren es so. Diese Spezifität macht man sich in der Arzneimitteltherapie wie auch in der Diagnostik zu nutze [Sanz et al. 2004].

Die meisten Wirbeltiere besitzen fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen (IgG, IgM, IgE, IgA, IgD), die in unterschiedlichen Teilen des Körpers vorkommen und verschiedene Aufgaben haben. Sie werden anhand ihrer unterschiedlichen Aminosäure-Sequenzen in den konstanten Teilen der schweren Kette eingeteilt. In dieser Arbeit werden ausschließlich IgG-Antikörper behandelt. IgG-Antikörper werden selbst in 4 Subklassen eingeteilt. Die Subklasse IgG₁ stellt den größten Anteil der IgGs im menschlichen Blut dar.

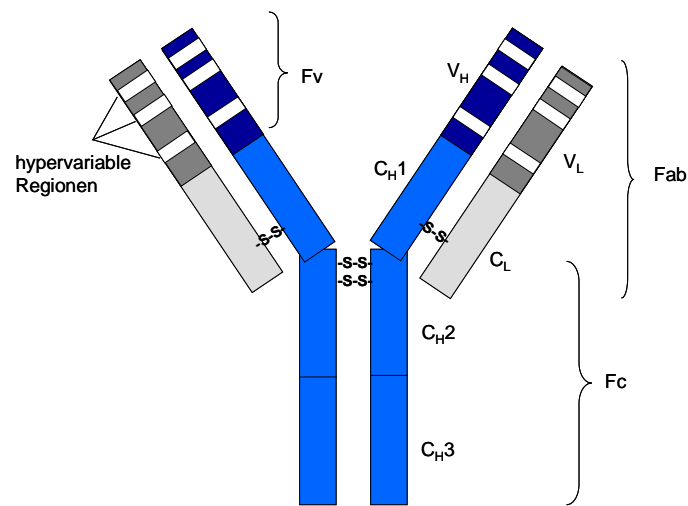


Abbildung 2.1.1 Struktur eines IgG Antikörpers. Blau: schwere Kette (heavy chain); grau: leichte Kette (light chain); (Fv: Antigenbindungsregion; V_H: variable Domäne schwere Kette; C_H1-3: konstante Domänen der schweren Kette; C_L: konstante Domäne der leichten Kette; V_L: variable Domäne der leichten Kette; Fab: fragment antigen binding; Fc: fragment crystallizable)

IgG-Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren Proteinketten (heavy chain: HC) und aus zwei identischen leichten Proteinketten (light chain: LC) (Abb. 2.1.1). Durch vier kovalente Disulfidbrücken sind diese miteinander Y-förmig verbunden. Eine Disulfidbrücke verbindet jeweils leichte und schwere Kette und zwei Disulfidbrücken verbinden die zwei schweren Ketten miteinander. Die leichte Kette besteht jeweils aus einer variablen und einer konstanten Domäne, die schwere Kette aus einer variablen und drei konstanten Domänen. Die variablen Domänen besitzen jeweils drei hypervariable Regionen. Die variablen Domänen in den Antigenbindungsregionen (Fv) bilden die Antigenbindungsstelle (Epitop). Oberhalb der Gelenkregion (hinge region) wird die leichte Kette mit der gebundenen oberen Hälfte der schweren Kette Fab-Fragment (fragment antigen binding) genannt. Die beiden unteren Teile der zwei schweren Ketten heißen Fc-Fragment [Martin A.C.R. und Allen J. 2007]. Papain

kann einen Antikörper enzymatisch in zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment (fragment crystallizable) spalten. Ein Fab-Fragment ist ungefähr 50 KiloDalton (kD) groß, ein Fc-Fragment ebenfalls, für einen kompletten Antikörper kann man ca. 150 kD rechnen.

Die Eigenschaften, wie Hydrophobizität und isoelektrischer Punkt, eines solchen Antikörpers hängen von seiner Aminosäure-Sequenz, seiner Faltung und seiner Glycosilierung ab [Liu et al. 2008a].

2.1.2 Cetuximab

Cetuximab ist ein rekombinanter, chimärer monoklonaler Antikörper. Er besteht aus einem humanen IgG₁ Antikörper, bei welchem der Fv-Teil murinen Ursprungs ist. [Goldstein et al. 1996]. Das Target von Cetuximab ist die extrazelluläre Domäne des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR epidermal growth factor receptor). Cetuximab bindet mit hoher Spezifität und höherer Affinität als EGF oder TGF- α (EGF epidermal growth factor, TGF- α transforming growth factor) [Baselga 2001]. Der Antikörper besteht aus vier Polypeptidketten, zwei identischen schweren Ketten, jede bestehend aus 499 Aminosäuren (AS) und zwei identischen leichten Ketten, jede bestehend aus 214 AS. Die vier Ketten werden über kovalente Disulfidbrücken (32 Cysteinreste) und nicht kovalente Brücken zusammengehalten. Die N-terminalen Reste der schweren Kette sind cyclisiert als Pyroglutamin. Cetuximab hat insgesamt ein molekulares Gewicht von 154 kD. Cetuximab wird mit 5 mg/ml in 10, 20, 50 oder 100 ml pro Vial als Erbitux[®] auf dem Markt angeboten. Weitere Bestandteile der Lösung Erbitux[®] sind Natriumchlorid, Glycin, Polysorbat 80, Citronensäure-Monohydrat, Natriumhydroxid und Wasser für Injektionszwecke [Fachinformation Erbitux[®] 2009].

Cetuximab ist zugelassen zur Verwendung gegen Kolorektalkarzinom ebenso wie gegen Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich. Der Antikörper hat eine relativ lange Halbwertszeit von 3-4 Tagen, deshalb beträgt die Initialdosis 400 mg Cetuximab/m² Körperoberfläche. Danach werden einmal wöchentlich 250 mg Ceruximab/m² Körperoberfläche verabreicht. Cetuximab wird entweder in Kombination mit Chemotherapie (Irinotecan, 5-Fluorouracil/Folinsäure) oder als Monotherapie nach vorangegangener Chemotherapie, in Kombination mit einer Strahlentherapie für eine lokal fortgeschrittene Erkrankung oder in Kombination mit einer Platin-basierten Chemotherapie für eine rezidivierende und/oder metastasierende Erkrankung gegeben [Fachinformation Erbitux[®] 2009].

Der EGF-Rezeptor ist ein 170 kD transmembranes Glycoprotein mit Tyrosinkinase-Aktivität. Er kommt normalerweise häufig in Epithelgeweben vor [Carpenter 1987]. Er gehört zur HER (human epidermal receptor)-Familie, welche Tyrosinkinasen darstellen. Die Signalwege über EGFR sind an der Steuerung der Überlebensfähigkeit von Zellen, des Ablaufs des Zellzyklus, der Angiogenese, Zellmigration sowie der zellulären Invasion bzw. Metastasierung beteiligt. EGF und TGF- α sind die häufigsten aktivierenden Liganden des EGFR-Rezeptors. Sie binden an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors (Abb. 2.1.2). Diese Bindung induziert den Rezeptor dazu zu dimerisieren und aktiviert die intrazelluläre Kinase, welche die Tyrosinreste an jedem Rezeptorpaar phosphoryliert. Danach laufen Signalkaskaden ab, welche die Gen-Transkription aktivieren, so dass Zellproliferation, Angiogenese, Metastase und ein Überleben der Zelle stattfinden kann [Baselga 2001]. EGFR ist ein Protooncogen und seine Aktivierung

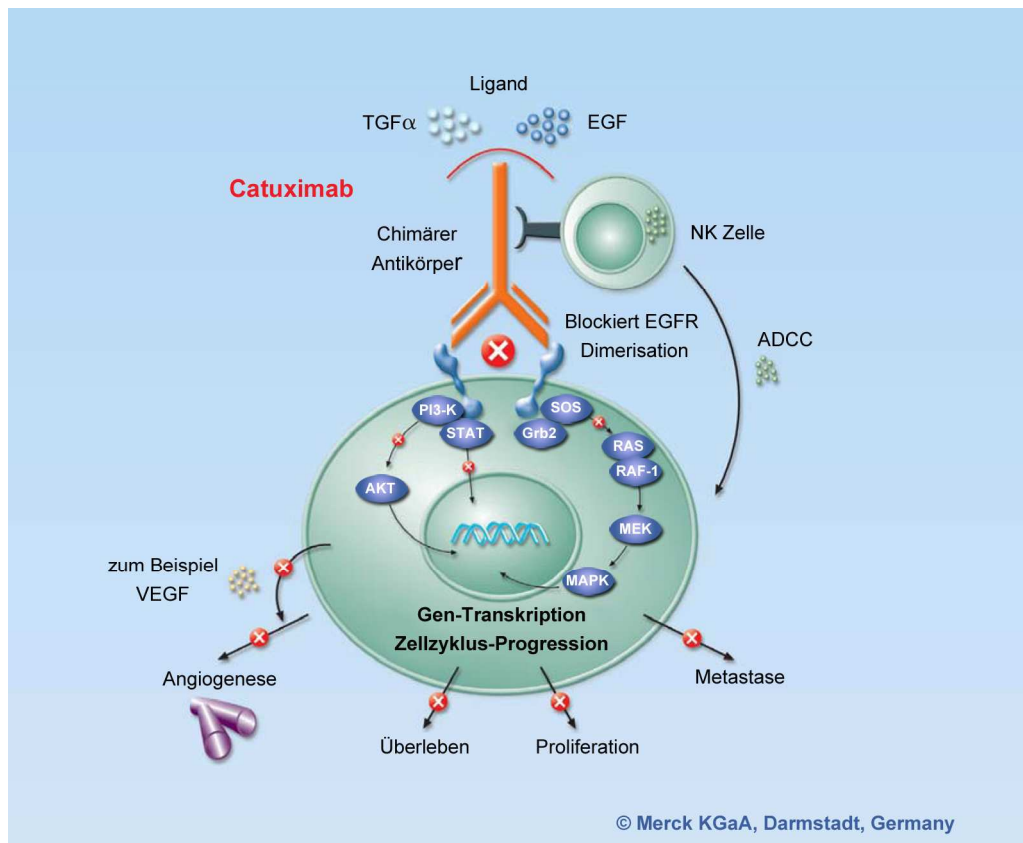


Abbildung 2.1.2 EGF-Rezeptor Signaltransduktion wird durch Wachstumshormone aktiviert, Dimerisierung des Rezeptors mit nachgeschalteter Phosphorylierung, über Signalwege wird Proliferation, Überleben der Zelle, Angiogenese und Methastase verursacht; Blockade des EGF-Rezeptors durch Cetuximab (modifiziert aus [Merck Serono 2003])

spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung vieler Krebsarten. Kolorektaler, Brust-, Lungenkrebs sowie Kopf- und Halstumore gehören dazu [Salomon et al. 1995]. Die Aktivierung und Überfunktion des EGFR kann durch Mutation oder Amplifikation der

kodierenden Gene wie aber auch durch Überproduktion eines der Liganden (EGF, TGF- α) zustande kommen [Baselga 2001]. Bei kolorektalem Karzinom konnte beispielsweise eine Expression von 25-77% EGFR festgestellt werden [Messa et al. 1998].

Cetuximab bindet extrazellulär an den EGF-Rezeptor, blockiert ihn damit und EGF oder TGF- α können nicht mehr binden. Es findet keine Dimerisierung mit nachfolgender Phosphorylierung der Tyrosinreste statt. Der Rezeptor-Antikörper-Komplex wird abgebaut und die Rezeptoren werden herunter reguliert [Ennis et al. 1991]. Durch die Blockade der Signalwege findet schlussendlich die Inhibition von Angiogenese und Differenzierung der Zelle sowie Apoptose statt [Baselga 2001]. Zusätzlich gibt es Hinweise dafür, dass Cetuximab über eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC antibody-dependent cellular cytotoxicity) das Immunsystem stimuliert und so Krebszellen zerstört [Naramura et al. 1993].

2.2 Instabilitäten von monoklonalen Antikörpern

2.2.1 Chemische Instabilitäten

Es gibt viele chemische Reaktionen, die für die Inaktivierung von Proteinen/Antikörpern verantwortlich sein können. Häufig entstehen irreversible Brüche oder es bilden sich kovalente Bindungen. Oftmals laufen die Reaktionen auch simultan ab [Reubsaet et al. 1998a; Wang 1999]. Einflüsse wie Formulierung, pH-Wert, Temperatur, Konzentration oder Hilfsstoffe forcieren manche chemischen Reaktionen. Teilweise verlieren die Proteine durch chemische Veränderung ihre Aktivität, führen zu Immunantworten, zeigen eine veränderte Rezeptorbindungsaktivität, eine erhöhte Antigenbindungsaktivität oder eine erhöhte Sensitivität gegenüber Proteasen *in vivo* [Cleland et al. 1993].

Die häufigsten chemischen Instabilitäten sind Deamidierungen, Oxidationen, Isomerisierungen, Hydrolysen, Racemisierungen und β -Eliminationen [Manning et al. 1989; Patro et al. 2002; Reubsaet et al. 1998a; Wang 1999]. Im Folgenden sollen diese Instabilitäten kurz erläutert werden.

Deamidierung

Die Deamidierung ist die Bildung einer freien Carboxylfunktion und häufigste Abbaureaktion in pharmazeutischen Proteinen [Wang 1999], meist verursacht durch pH-Wert-Änderung. Im Körper kann sie als Eliminierungsreaktion von Proteinen beobachtet werden. Sie tritt meist an

Asparagin- (Asn) oder Glutamin- (Gln) Resten auf. Die Hydrolyse von Asn mit der Bildung von Asparaginsäure (Asp) wie auch die Hydrolyse von Gln mit der Bildung von Glutaminsäure (Glu) entsteht entweder auf direktem Weg oder über eine reversible Bildung eines cyclischen 5-Ring-Intermediates. Dieser Ring wird durch intramolekularen nucleophilen Angriff des N-Atoms der benachbarten Aminosäure auf die Carbonylfunktion der Amidgruppe von Asn gebildet und spaltet sich danach so auf, dass Asp und Iso-Asp entsteht [Peters und Trout 2006]. Die Hydrolyse von Gln ist langsamer als die Hydrolyse von Asn, denn die Bildung eines cyclischen 6-Ring-Intermediates mit Imidgruppe ist ungünstiger als die des Asn-5-Rings [Reubsaet et al. 1998a]. Deamidierungen treten häufig basen- oder säurenkatalysiert auf, auch erhöhte Temperaturen oder Ionenstärke können Ursache sein.

Oxidationen

Oxidationen treten vorzugsweise an den Aminosäuren Methionin (Met) [Chumsae et al. 2007; Liu et al. 2008b], Cystein (Cys) aber auch in Histidin (His), Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp) und Prolin (Pro) auf [Reubsaet et al. 1998a]. Methionin kann zu einem Sulfoxid oder unter drastischeren Bedingungen auch zu einem Sulfon oxidiert werden. Die Oxidation von Cystein kann zu inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken oder schrittweise zu Sulfensäure (RSOH), Disulfid (RSSR), Sulfinsäure (RSO₂H) oder Sulfonsäure (RSO₃H) führen [Manning et al. 1989; Patro et al. 2002]. Oxidationen an Cystein und Methionin werden meist durch reaktive Sauerstoff-Spezies verursacht. Auch Licht und die Anwesenheit von Metall-Ionen können Oxidationen hervorrufen, in diesem Fall können dann Aggregate durch die Oxidation von Tyrosin oder Cystein entstehen [Reubsaet et al. 1998a].

Hydrolyse

Die Hydrolyse (in diesem Fall auch Proteolyse genannt) tritt an der Amidbindung des Proteinrückgrats auf. Sie findet an der N- oder C-terminalen Bindung eines Asparaginrestes statt. Über die Bildung eines 5-Ring-Intermediates (cyclisches Anhydrid) findet die C-terminale Hydrolyse, über die des 6-Ring-Intermediates (cyclisches Anhydrid) die N-terminale Hydrolyse statt. Oft tritt die Hydrolyse im Anschluss an eine Deamidierung auf. Asparagin-Reste sind sehr anfällig. Diese Anfälligkeit erhöht sich noch, wenn sich in Nachbarschaft Prolin oder Glutamin befindet [Reubsaet et al. 1998a; Usami et al. 1996; Wang 1999].

Isomerisierung

Eine Isomerisierung kann, wie oben bereits erwähnt, bei Deamidierungen entstehen. Der Verlauf über das cyclische 5-Ring-Intermediat mit Imidgruppe kann nach Aufbruch des Ringes in der Iso-Form enden [Dehart und Anderson 2007; Manning et al. 1989; Wang 1999].

Racemisierung

Auch Racemisierungen treten vorzugsweise an den Asparagin- oder Glutamin-Resten auf. Sie sind meist basenkatalysiert und verlaufen über ein Carbanion. Es entstehen Diastereomere, die sich durch Hydrophobizität und Polarität von der nativen Form unterscheiden [Reubsæet et al. 1998a].

β-Elimination

Die β-Elimination tritt meist an Cystein-Resten nach Behandlung mit hohen Temperaturen und hohen pH-Werten auf. Der Reaktionsmechanismus ist dem der Racemisierung ähnlich [Reubsæet et al. 1998a]. Die Disulfidbrücke wird zerstört und es resultiert ein Thiol, welches über andere Abbauewege abgebaut wird. Auch Metallionen können hierbei katalysierend wirken [Manning et al. 1989].

2.2.2 Physikalische Instabilitäten

Zu physikalischen Instabilitäten bei Proteinen zählt man Aggregation, Präzipitation, Adsorption und Denaturierung. Meist ist bei diesen Instabilitäten die höhere Ordnung der Struktur verändert [Cleland et al. 1993; Manning et al. 1989].

Denaturierung

Die Veränderung der nativen Konformation nennt man Denaturierung. Bei einer Denaturierung ist die Tertiärstruktur und teilweise die Sekundärstruktur der Proteine zerstört [Manning et al. 1989]. Denaturierung kann direkt ablaufen mit der Entstehung eines entfalteten Proteins, oder sie läuft über Zwischenstufen ab [Uversky et al. 2001; Wang 2005].

Adsorption

Adsorption gehört ebenfalls zu den physikalischen Instabilitäten, denn Proteine adsorbieren über ihre hydrophoben Aminosäuren (z.B. Phenylalanin (Phe), Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr), Alanin (Ala), Valin (Val), Leucin (Leu), Isoleucin (Ile)) häufig an hydrophoben

Grenzflächen wie Luft [Harrison et al. 1998; Martin et al. 2002], Metall [Bee et al. 2009a; Tyagi et al. 2009] oder Kunststoff [Gombotz et al. 1996]. Auch Glas [Volkin und Middaugh 1996] oder Filtermembranen [Wang 1999] können Proteine adsorbieren. Nach den Adsorptionsvorgängen kann ein Verlust an Protein in der Lösung detektiert werden.

Aggregation/Präzipitation

Aggregate entstehen, wenn die Proteine anfangen sich zu entfalten und z.B. hydrophobe Gruppen dadurch ihre Position ändern und miteinander in Wechselwirkung treten können [Carpenter et al. 1999; Liu et al. 2008a]. Die Aggregation kann irreversibel oder reversibel sein (Abb. 2.2.1). Innerhalb der Aggregate können verschiedene Bindungsarten auftreten. Im Falle von nicht-kovalenten Bindungen können sich die Aggregate teilweise wieder in die Ausgangsform zurückbilden (z.B. bei hydrophoben Wechselwirkungen). Im Falle von kovalenten Bindungen wie z.B. Disulfidbrücken ist die Aggregation nicht mehr reversibel [Liu et al. 2008a; Philo 2006]. Die physikalische Assoziation von Proteinen ohne Änderung der Primärstruktur nennt man physikalische Aggregation. Hingegen wird die Aggregation, die durch kovalente Bindungen entsteht, chemische Aggregation genannt [Wang 2005].

Die Größe der Aggregate kann stark variieren. Es kann zur Bildung von kleinen Aggregaten kommen, die noch löslich sind und beispielsweise mittels Größenausschlußchromatographie (SEC) detektiert werden können. Oder es entstehen größere Aggregatzusammenschlüsse, die dann nicht mehr löslich sind und als Opaleszenz oder sogar Trübung in der Lösung sichtbar werden [Parkins und Lashmar 2000]. Sehr große sichtbare Aggregate, die meist aus denaturiertem Material bestehen, werden auch Präzipitate genannt.

Von Mahler et al. wurde eine Abbildung publiziert, in der der Aggregationsmechanismus für Antikörper dargestellt ist [Mahler et al. 2005b]. Dieser ist etwas modifiziert in Abb. 2.2.1 zu sehen. Zunächst bilden sich Dimere (bestehend aus zwei Antikörpern), die entweder nativen Ursprungs oder denaturierten Ursprungs sind. Dann lagern sich immer mehr denaturierte oder native Antikörper an und das Aggregat wächst. Die nativen Aggregate können sich jederzeit in denaturierte Aggregate umformen, umgekehrt ist dies aber nicht möglich. Allerdings können größere Aggregat-Zusammenschlüsse wieder in kleinere, ja sogar einzelne Antikörper zerfallen.

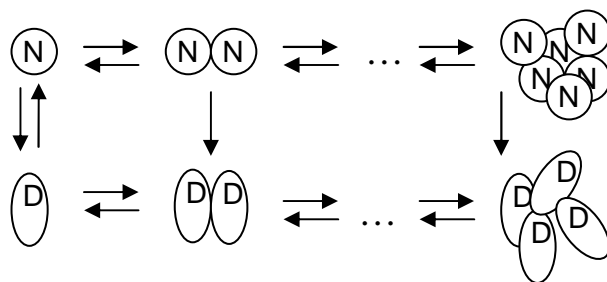


Abbildung 2.2.1 Aggregationsmechanismus von Proteinen: N steht für das native, D für das denaturierte Protein; Entstehung von zunächst löslichen Aggregaten, mit weiterem Wachstum dann von unlöslichen Aggregaten (modifiziert aus [Mahler et al. 2005b])

Ursache für physikalische Instabilitäten wie Aggregation können eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren sein wie z.B. Temperatur [Hawe et al. 2009], Schüttel- oder Rührbewegung [Kiese et al. 2008], Frier-Tau-Stress [Fradkin et al. 2009], Lichtexposition [Roy et al. 2009], hydrophobe Oberflächen [Bee et al. 2009a] oder Lyophilisation [Salnikova et al. 2008]. Während des Arbeitens mit Proteinen können durch verwendete Materialien, die z.B. noch etwas Silikonöl enthalten, Aggregate erzeugt werden [Thirumangalathu et al. 2009]. Sogar Metallionen reichen aus, um verschiedene Aggregate zu erzeugen [Bauer et al. 1997]. Auch der pH-Wert und die Proteinkonzentration haben einen Einfluss auf die Aggregatbildung. Die Anwesenheit von Aggregaten stellt ein großes Problem in parenteralen Lösungen dar, denn sie können Nierenversagen, anaphylaktische Reaktionen wie Fieber, Kopfschmerzen und Schüttelfrost verursachen [Demeule et al. 2006; Ryan et al. 1996]. Es ist also sehr wichtig, Instabilitäten frühzeitig zu erkennen.

2.3 Formulierungen für monoklonale Antikörper

Die Formulierungsentwicklung kann in drei verschiedene Bereiche eingeteilt werden, die Präformulierung, die Formulierung und den späteren Scale-up. In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche im Rahmen der Präformulierung gemacht. Diese beinhaltet die Charakterisierung des Antikörpers (AK) hinsichtlich physikochemischer Parameter, wie z.B. isoelektrischer Punkt. Außerdem werden in der Präformulierung erste Kenntnisse über die Qualität und Stabilität des Proteins/AK eingeholt. Um die Stabilität des Proteins zu testen, wird das Protein verschiedenen Stressmethoden unterzogen, wie z. B. Schüttelstress [Mahler et al. 2005b], Lichtstress [Kerwin und Remmele, Jr. 2007; Roy et al. 2009], Einlagerung bei verschiedenen Temperaturen [Liu et al. 2006] oder Frier-Tau-Stress [Carpenter et al. 1999]. Auch wird der für die Stabilität beste pH-Bereich der Lösung ermittelt [Chang und Hershenson 2002; Szenczi et al. 2006; Zheng und Janis 2006]. Andere Faktoren wie

notwendige Hilfsstoffe, das richtige Packmittel und die Lagerungsbedingungen [Chang und Hershenson 2002] werden ebenfalls untersucht, diese werden auch in der späteren Formulierungsentwicklung weiter geführt. Die Herstellungsweise der Formulierung sollte aber schon in der Präformulierung so gewählt werden, dass sie auch für den Scale-up verwendet werden kann. Weitere Vorgaben, wie eine Haltbarkeit des Produktes von mindestens 18 Monaten (zumindest im gefrorenen Zustand), sollten eingehalten werden, ebenso wie die gängigen Prüfungsanforderungen an parenterale Lösungen wie Sterilität, Isotonie und euhydrischen pH [Nayar und Manning 2002].

Nicht jedes Protein oder jeder AK verhält sich gleich, die Stabilität eines Proteins ist von seiner individuellen Aminosäure-Sequenz, von seinem isoelektrischen Punkt (pI), seiner Hydrophobizität und seinem Zucker Gehalt abhängig [Bogard, Jr. et al. 1989]. Auch Lyophilisation ist eine Möglichkeit der Formulierung [Wang et al. 2007]. Verschiedene Aspekte, die bei der Formulierung von flüssigen Proteinlösungen bedacht werden sollten, werden im Folgenden vorgestellt.

Tenside

Zur Erhaltung der physikalischen Stabilität werden Tenside eingesetzt [Kerwin 2007], welche die Oberflächenspannung der Proteinlösung herabsetzen und eine Adsorption des Proteins an hydrophobe Grenzflächen, wie z. B. die Luft-Wasser-Grenzfläche verringern [Wang 1999]. Somit aggregieren die Proteine nicht so schnell. Man kann die Tenside in nichtionische und ionische Tenside einteilen. Nichtionische Tenside werden in der Proteinstabilisierung meist bevorzugt, da ionische Tenside oft an polare oder unpolare Gruppen innerhalb des Proteins binden und Denaturierung verursachen können [Giancola et al. 1997]. Auf Grund von relativ geringen CMCs (Kritische Mizellbildungskonzentration) der meisten nichtionischen Tenside [Bam et al. 1995] reichen oft schon geringe Mengen Tensid aus, um die Proteine z.B. gegen Schütteln oder Rühren zu stabilisieren [Kiese et al. 2008]. Unterschiedliche Stressarten verlangen aber auch unterschiedliche Tenside [Charman et al. 1993]. Beispielsweise stabilisiert Tween 80 sehr gut gegen mechanischen Stress wie Schütteln, führt aber zu einer Erhöhung der Aggregationsbildung während der Einlagerungen bei erhöhten Temperaturen [Wang et al. 2008b]. Dasselbe konnte bei Pluronic F-68 beobachtet werden [Katakam et al. 1995]. Der Wirkmechanismus der Tenside im Falle von physikalischem Stress ist noch nicht endgültig aufgeklärt [Garidel et al. 2009]. Eine schwache Bindung ist nur zwischen Tween 20 und rhGh (rekombinant hergestelltes Somatotropin) bekannt [Bam et al. 1998].

Hilfsstoffe, Zucker

Weiterhin werden zur Stabilisierung von Proteinlösungen während der Lagerung und der Herstellung z.B. verschiedene Zucker [Szenczi et al. 2006], Polyole [Paborji et al. 1994], Aminosäuren [Jensen et al. 1996] und Polymere [Zhang et al. 1995] verwendet. Zucker werden häufig eingesetzt, um die physikalische Stabilität von Antikörpern zu erhalten [Wang et al. 2007]. Der Wirkmechanismus wird mit „preferential exclusion“ beschrieben, was bedeutet, dass die Zucker im Kontakt zu den Proteinen ausgeschlossen werden. Das bedeutet, das Protein umgibt sich mit einer Hydratschicht und der Zucker befindet sich außerhalb dieser Hydratschicht. Wenn das Protein nun denaturieren und entfalten würde, würde es dadurch an Größe zunehmen. Als Folge müsste sich die Hydratschicht auch vergrößern, was thermodynamisch ungünstig wäre, da noch mehr Zucker ausgeschlossen werden müsste. Deshalb bleibt das Protein in seiner ursprünglichen Konformation und entfaltet sich nicht so leicht. Der Betrag der freien Enthalpie der Entfaltung ist erhöht [Kendrick et al. 1997].

Antioxidantien

Als Antioxidans wird z.B. Ascorbinsäure verwendet. Zum Schutz vor Oxidationsvorgängen an festen Oberflächen, wie z.B. an Lyophilisaten, werden manche Zubereitungen direkt nach Lyophilisation unter Vakuum verschlossen oder durch Begasung mit einem Inertgas wie Argon oder Stickstoff vor Oxidation geschützt [Zimmer 2003].

Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration ist ein wichtiger Aspekt in der Proteinformulierung. Häufig werden hohe Dosen an Protein verabreicht. Um das Injektionsvolumen gering zu halten, sind hochkonzentrierte Proteinlösungen von Vorteil, besonders wenn das Medikament subkutan (s.c.) gegeben werden soll (AK-Lösungen mit 50 mg/ml und höher). Allerdings bringen hochkonzentrierte Proteinlösungen einige Nachteile mit sich. Zum einen kann eine stärkere Aggregation während der Lagerung auftreten, zum anderen nimmt die Viskosität der Lösung zu, so dass die Spritzbarkeit überprüft werden muss [Shire et al. 2004]. Die Viskosität kann durch eine Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von NaCl erniedrigt werden [Liu et al. 2005]. Auch bestimmte pH-Werte oder die Zugabe von Histidin können teilweise die Viskosität reduzieren [Saluja et al. 2006; Wang et al. 2007]. Wie gut sich ein Protein in einer Lösung löst, ist ein weiterer Aspekt. Um das Lösungsvermögen in den hochkonzentrierten Antikörper-Lösungen zu verbessern, werden z.B. Tenside zugegeben oder eine Kombination aus L-Arginin und L-Glutamin [Golovanov et al. 2004].

pH-Wert

Ein anderer wichtiger Aspekt in der Proteinformulierung ist der gewählte pH-Wert. Häufig beginnt die Formulierungsentwicklung mit einem pH-Screen, um den besten pH-Wert als Kompromiss zwischen Stabilität und physiologischer Verträglichkeit zu finden. Der pH-Wert beeinflusst die physikalische Stabilität eines Proteins, da er die Anzahl und Verteilung der Ladungen auf der Proteinoberfläche bestimmt. Es ist z. B. bekannt, dass die Stabilität der Konformation eines IgGs mit Erniedrigung des pH-Wertes ($\text{pH} < 7$) abnimmt, aber die Resistenz gegen Aggregation zunimmt [Szenczi et al. 2006]. Auch die chemische Stabilität eines Antikörpers wird vom pH-Wert beeinflusst. Beispielsweise spielt sie eine Rolle bei Degradationswegen wie Deamidierungen [Peters und Trout 2006], Fragmentierungen und Isomerisierungen [Wang et al. 2007]. Aber nicht nur der pH-Wert hat einen Einfluss auf die Stabilität von Proteinen, sondern auch die Art des gewählten Puffers [Wang 1999]. So konnte ein unterschiedliches Aggregationsverhalten bei gleichem pH-Wert beim Einsatz unterschiedlicher Puffer gezeigt werden [Kameoka et al. 2007].

2.4 Analytische Methoden zur Detektion von Instabilitäten

Das Auftreten von Instabilitäten während Herstellung, Lagerung und Verabreichung ist ein Problem, diese Instabilitäten jedoch auch zu identifizieren, ein anderes. Da es für Proteine keine Analysenmethode gibt, mit welcher die komplette Bandbreite der Instabilitäten erfasst werden kann, müssen verschiedene Methoden kombiniert werden [Wang 1999]. Für chemische Instabilitäten sind das teilweise andere Methoden als für die physikalischen Instabilitäten.

2.4.1 Analyse der chemischen Instabilitäten

Deamidierungen z. B. können mittels RP-HPLC (reversed phase HPLC) ermittelt werden, da hierbei Veränderungen in der Hydrophobizität bzw. Polarität entstehen. Sehr sinnvoll ist dabei die Kopplung an die Massenspektrometrie [Reubsaet et al. 1998a], da sich auch die Masse ändert. Ob durch die Deamidierung auch die Tertiärstruktur verändert wurde, kann anhand der SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) festgestellt werden. In der IEF (isoelektrische Fokussierung) kann man eine Verschiebung zu geringeren isoelektrischen Punkten erkennen, wenn Deamidierungen vorliegen. Oxidationen verursachen eine Änderung hin zu höherer Hydrophilie und Polarität. Auch dies kann mittels RP-HPLC ermittelt werden [Reubsaet et al. 1998a]. Falls aromatische Aminosäuren

oxidieren, kann dies auch über Fluoreszenz- oder UV-Absorptionsmessungen detektiert werden. So gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen analytischen Methoden, die in Kombination auf bestimmte Instabilitäten hinweisen können.

Meist werden aber in der frühen Phase der Formulierungsentwicklung keine Methoden eingesetzt, die eine genaue Identifizierung der chemischen Instabilitäten ermöglichen (z.B. ob es sich um eine Oxidation oder Deamidierung handelt). In der Regel werden Methoden verwendet, die angeben, ob sich das Protein chemisch verändert hat. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Methoden eingesetzt wie z.B. Gelelektrophorese, um herauszufinden, ob beispielsweise Strangbrüche oder kovalente Aggregate entstanden sind [Parkins und Lashmar 2000]. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wird verwendet, um pI-Veränderungen festzustellen. Circular dichroismus (CD) oder Fluoreszenzmessungen werden benutzt, um Sekundär- oder Tertiärstrukturveränderungen zu detektieren [Demeule et al. 2007a; Kuelto und Middaugh 2007].

2.4.2 Analyse der physikalischen Instabilitäten

Die Analyse physikalischer Instabilitäten kann, ebenso wie die Analyse chemischer Instabilitäten, nicht nur mit einer Analysenmethode erfolgen. Da verschieden große Aggregate/ Präzipitate entstehen können und die meisten Analysenmethoden nur eine bestimmte Bandbreite an Aggregatgröße erfassen können, ist die Kombination von verschiedenen Methoden Voraussetzung für eine aussagekräftige Analyse. In Abb. 2.3.1 ist die Erfassung unterschiedlicher Aggregatgrößen mit unterschiedlichen Methoden dargestellt. In dieser Abbildung sind die wichtigsten Analysenmethoden zum Nachweis von Aggregaten aufgeführt. Da sich die vorliegende Arbeit vorzugsweise mit Aggregaten befasst, wurden alle die hier aufgeführten Methoden (abgesehen von der dynamischen und statischen Lichtstreuung) verwendet. Die SE-HPLC (Größenausschluss-Chromatographie) kann Monomere sowie lösliche Aggregate detektieren [Reubsaet et al. 1998b]. Sie trennt sie über eine Gelsäule mit entsprechender Porengröße, so dass die großen Aggregate zuerst eluiert werden und die kleinen Monomere und Degradationsprodukte zunächst in den Poren des Gels hängen bleiben und später eluieren. Mit dieser Methode lassen sich die löslichen Aggregate und der Monomergehalt bestimmen. Auch physikalische Instabilitäten wie Präzipitation/ Adsorption können über den absoluten Verlust an Monomeren hiermit detektiert werden.

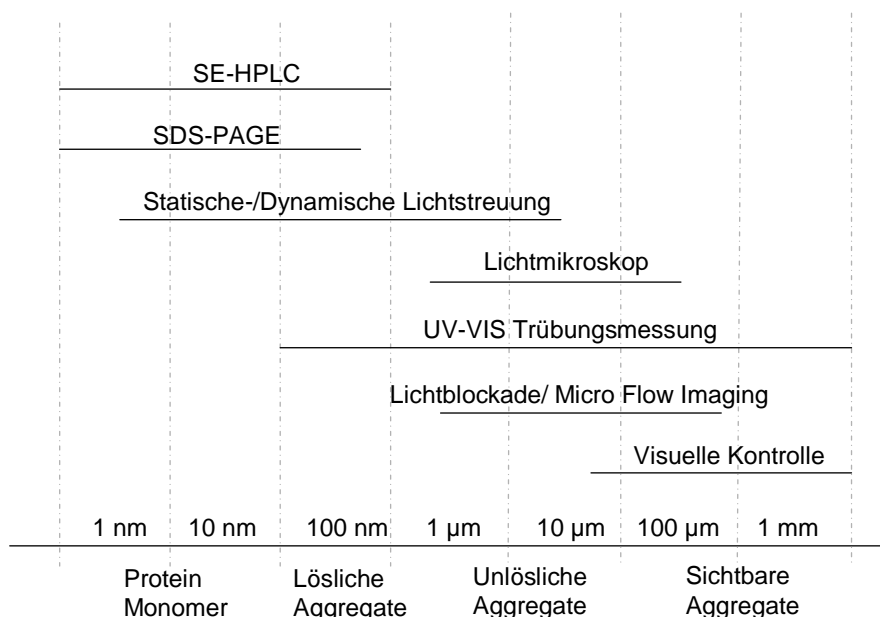


Abbildung 2.3.1 Aggregatgrößenbereiche, die durch verschiedene analytische Methoden detektiert werden können (modifiziertes Schaubild aus [Mahler 2008])

Die SDS-PAGE trennt nahezu denselben Aggregatgrößenbereich, mit dem Zusatz, dass die hier erfassten Aggregate kovalente Aggregate sind, die sich durch Natriumdodecylsulfat (SDS) nicht aufspalten lassen. In dieser Methode werden die Proteine entfaltet und mit SDS beladen, so dass sie rein nach ihrer Größe im Gel aufgetrennt werden. Behandelt man die Proben zuvor mit DTT (Dithiotreitol), dann auch reduzierende SDS-PAGE genannt, kann zusätzlich noch erkannt werden, ob die Aggregate durch Disulfidbrücken (kovalente Aggregate) miteinander verknüpft waren [Reubsaet et al. 1998b; Zhang und Czupryn 2002].

Die statische oder dynamische Lichtstreuung wird verwendet, um Aggregate in einer Proteinlösung zu detektieren [Gun'ko et al. 2003; Mahler et al. 2005b; Nguyen et al. 2003]. Allerdings entsteht hier das Problem, dass beim Vorliegen mehrerer Populationen, sprich Monomeren und verschiedenen Aggregat-Fraktionen, keine sehr aussagekräftigen Ergebnisse mehr zu erzielen sind. Aus diesem Grund wurde diese Methode für die vorliegende Arbeit nicht eingesetzt.

Mittels Lichtmikroskop kann zum einen die Größe, aber zum anderen vor allem die Form größerer Aggregate betrachtet werden [Demeule et al. 2007b]. Weiterhin ist hier die Unterscheidung zu Luftblasen möglich. Die Unterscheidung der Aggregate von Luftblasen kann auch anhand von „Micro flow imaging“ (MFI) getroffen werden [Sharma et al. 2007]. Hierbei wird die Lösung durch eine Zelle gepumpt und dabei ständig mikroskopiert und fotografiert. Die zu detektierenden Aggregatgrößenbereiche bei MFI und Lichtmikroskop sind annähernd gleich.

Die Lichtblockade kann ebenfalls ungefähr diesen Größenbereich an Aggregaten auflösen. Es handelt sich zusätzlich um eine Arzneibuchmethode, die in der Monographie 2.9.19 beschrieben ist [Europäisches Arzneibuch 6.0 2008b]. Bei dieser Methode wird die Probelösung durch einen sehr dünnen Spalt geschickt. Durch diesen Spalt läuft auch ein Lichtstrahl, der von den Aggregaten in der Lösung blockiert wird. Aufgrund ihrer Größe blockieren nun die Aggregate in unterschiedlichem Ausmaß den Lichtstrahl und dementsprechend berechnet und zählt das Gerät die Größe und die Anzahl der Partikel in der Lösung.

Die Trübungsmessung mittels UV/VIS-Spektroskopie bei 350 oder 550 nm kann einen großen Bereich an Aggregatgrößen detektieren. Bei diesen Wellenlängen absorbieren die Proteine nicht mehr (bzw. deren aromatischen Aminosäuren), aus diesem Grund kann hier die Lichtstreuung gemessen werden. Die Trübungsmessung bei 350 nm wurde erstmals 1994 von Eckhardt et al. publiziert [Eckhardt et al. 1994].

Auch die visuelle Kontrolle ist eine aufschlussreiche Methode, um die Proteinlösung auf physikalische Instabilitäten zu beurteilen [Europäisches Arzneibuch 6.0 2008a; Europäisches Arzneibuch 6.0 2008c]. Die Form, Größe und Anzahl an visuellen Aggregaten kann hiermit begutachtet werden. Auch ist es wichtig, die Lösung auf Schaumbildung hin zu untersuchen, damit ein Aufschwimmen von Aggregaten wie auch Luft innerhalb der Lösung nicht durch andere Methoden falsch beurteilt wird.

Zusammenfassend müssen also nicht zwangsläufig alle beschriebenen Methoden durchgeführt werden, allerdings sollte der Aggregatgrößenbereich durch zwei bis drei Methoden abgedeckt sein. Beispielsweise würde eine Kombination von SEC, Trübungsmessung mittels UV/VIS-Spektroskopie und visueller Kontrolle ausreichen, um Monomere, lösliche und unlösliche Aggregate/ Präzipitate zu detektieren.

Denaturierungen können beispielsweise mittels Fluoreszenzspektroskopie oder FTIR (Fourier Transform infrared spectroscopy) ermittelt werden.

2.5 Stressarten

Antikörper sind während der Herstellung, Formulierung, Lagerung und Verabreichung verschiedensten Stressbedingungen wie Temperaturveränderungen, Rühr- und Schüttelvorgängen bis hin zu Scherung bei der Verabreichung durch eine Nadel ausgesetzt. Da es sich bei Antikörpern um Proteine handelt, sind diese besonders empfindlich gegenüber solchen Stressbedingungen [Patro et al. 2002; Wang 1999]. Sie verursachen die oben

aufgeführten Instabilitäten. Um nun das Protein bzw. den Antikörper vor solchen Stressbedingungen zu schützen und Instabilitäten zu vermeiden oder zu minimieren, werden die Antikörper in geeigneten Formulierungen verarbeitet [Wang et al. 2007]. Beispielsweise wird der pH-Wert hinsichtlich Stabilität optimiert oder Hilfsstoffe wie Tenside werden zum Schutz gegen mechanischen Stress eingesetzt [Bam et al. 1998]. Ob diese Formulierungsansätze tatsächlich stabilisierend wirken, wird in der Formulierungsentwicklung über absichtlich verursachten Stress geprüft. Diese Stresstests sollen die stabilste Formulierung ermitteln und die Robustheit der Formulierung beweisen. Es gibt einige Richtlinien, z.B. die für den Lichtstress [ICH Guideline Q1B 1996], die genaue Stressparameter vorgeben. Für den mechanischen bzw. physikalischen Stress, der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist, gibt es bisher keine Richtlinien, so dass entsprechende Untersuchungen von der universitären Forschung bis zur Pharmaentwicklung mit unterschiedlichen Parametern durchgeführt werden.

Schüttelstress/Rührstress

Schüttelstress tritt vorzugsweise während des Transportes auf, Rührstress vorzugsweise während der Herstellung. Um diese Stressarten genauer zu untersuchen, wird in der Formulierungsentwicklung meist die Proteinlösung in kleinen Vials auf einem Schüttler mit einer Rechts-Linksbewegung geschüttelt oder die Lösung wird in kleinen Vials mittels eines kleinen Magnetrührstäbchens auf einer Rührplatte gerührt [Kiese et al. 2008; Mahler et al. 2005b]. Das Schütteln und Rühren erzeugt hydrophobe Luft-Wasser-Grenzflächen, an welchen sich die Proteine mit ihren hydrophoben Gruppen anlagern und entfalten [Wang 1999]. Dies führt dann zur Aggregation. Die hydrophoben Grenzflächen müssen aber nicht zwangsläufig Luft sein, auch Edelstahl, Glas, Gummi oder Plastik kann Aggregation verursachen [Bee et al. 2009a; Tyagi et al. 2009]. Aggregation, verursacht durch Schütteln, konnte nicht nur bei IgG-Antikörpern [Kiese et al. 2008] beobachtet werden, sondern auch bei Insulin [Brange et al. 1997], Hämoglobin [Kerwin et al. 1999] und hGH (Somatotropin) [Bam et al. 1998; Katakam und Banga 1997]. Proteine reagieren aber unterschiedlich auf Schüttelstress, dies hängt von der Oberflächenspannung der Lösung [Maa und Hsu 1997], Starrheit der Proteinstruktur und Anzahl der hydrophoben exponierten Reste [Wang 1999], wie aber auch von ihrer Adsorptionsneigung an hydrophoben Oberflächen [Martin et al. 2002] ab. Diese Adsorptionsneigung wird wiederum durch die Proteineigenschaften, das Molekulargewicht ebenso wie Konzentration bestimmt. Die Art und Stärke des gewählten Stresses hat natürlich ebenfalls einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten [Kiese et al.

2008]. Neben dem Kontakt zu hydrophoben Grenzflächen wird nämlich auch Scherstress, der bei Schüttel- oder Rührbewegungen auftritt, als Grund für Aggregation genannt [Oliva et al. 2003; Patapoff und Esue 2009].

Zur Stabilisation werden gegen mechanischen Stress vorzugsweise Tenside eingesetzt. Sie konkurrieren mit den Proteinen um den Platz an den hydrophoben Grenzflächen. Aufgrund des geringeren Platzes an den Grenzflächen entfalten sich folglich dort weniger Antikörper oder die Tenside binden direkt an das Protein und schützen es so [Bam et al. 1998; Webb et al. 2002a; Webb et al. 2002b].

Temperatur

Proteine sind normalerweise in einem bestimmten Temperaturbereich stabil. Außerhalb dieses Bereiches kann eine Denaturierung auftreten, welche irreversibel oder reversibel sein kann [Wang 1999]. Temperaturerhöhungen führen zur Bildung flexiblerer Proteinstrukturen mit mehr Protein-Protein-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen werden geschwächt und hydrophobe Bindungen werden gestärkt [Jaenicke 1991]. Bei einer Temperaturniedrigung hingegen ist eine Abnahme der Stärke hydrophober Wechselwirkungen und Veränderungen des pH-Wertes oder der Ionenstärke möglich, was folglich auch zu einer Abnahme der biologischen Aktivität führen kann [Bock und Frieden 1978; Patro et al. 2002].

Thermodynamisch resultiert die Proteinstabilität aus zwei entgegengesetzten Kräften, der Enthalpie und der Entropie. Der enthalpische Beitrag wirkt stabilisierend, während der entropische Beitrag destabilisierend wirkt. Die Proteinstabilität nimmt mit ansteigender Temperatur ab, weil die Entropie steigt und die freie Enthalpie des denaturierten Zustandes abnimmt [Wang 1999].

Eine höhere Temperaturstabilität kann durch Einstellung des pH-Wertes, der Konzentration [Qi et al. 1995], der Ionenstärke [Wang 2005] oder der Zugabe von Hilfsstoffen wie Polyaminen [Rezaei-Ghaleh et al. 2007] oder Tensiden [Arakawa und Kita 1999] gewonnen werden [Wang 2005]. Um die Robustheit einer Formulierung zu bewerten oder bei verschiedenen Formulierungen die beste Formulierung ausfindig zu machen, werden die Proteinlösungen bei erhöhten Temperaturen eingelagert. Ausgehend von diesen Einlagerungen können auch Langzeitstabilitäten bei geringeren Temperaturen berechnet werden.

Frier-Tau-Stress

Während der Entwicklung eines Proteinarzneimittels kann es sein, dass die Proteinlösung häufiger gefroren und wieder aufgetaut werden muss. Oft werden z.B. größere Gebinde an Proteinen in gefrorenem Zustand gelagert. Durch das Einfrieren und Auftauen können Aggregate entstehen [Hawe et al. 2009; Wang 2005], zum einen dadurch, dass Proteine an Eis-Wasser-Grenzflächen denaturieren [Patro et al. 2002], zum anderen durch die Aufkonzentrierung der gelösten Stoffe. Falls das Protein empfindlich gegenüber hoher Ionenstärke oder einem bestimmten Stoff ist, kann diese Aufkonzentrierung zur Denaturierung führen [Carpenter et al. 1999]. Auch eine Änderung des pH-Wertes kann entstehen [Wang 2000], welche ihrerseits instabilisierend auf das Protein wirkt. Die Aktivität des Antikörpers kann teilweise verloren gehen [Hazen et al. 1988]. Mit „Kryoprotektoren“ wie Zuckern, Aminosäuren, Polyolen, anderen Proteinen oder synthetischen Polymeren kann eine Denaturierung oder Aggregation des Proteins beim Einfrieren vermieden werden [Carpenter et al. 1999].

Lichtstress

Proteinlösungen werden zur Erleichterung der visuellen Kontrolle meist in durchsichtigen Flaschen verpackt, obwohl viele Proteine durch Licht Instabilitäten zeigen [Kerwin und Remmele, Jr. 2007]. Durch ihre Umverpackung werden sie jedoch vor Licht geschützt. Das Ausmaß der Instabilitäten hängt zum einen von der Lichtintensität und Wellenlänge ab, zum anderen auch von dem Protein selbst [Patro et al. 2002]. Die Lichtexposition verursacht häufig Aggregation, meist nach vorheriger Oxidation. Die primäre Photooxidation findet an den Aminosäureresten Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Cystein statt [Kerwin und Remmele, Jr. 2007]. Auch von Radikalbildung und anschließender Disulfidbrückenbindung, welche zur Aggregation führt, ist in der Literatur berichtet worden [Roy et al. 2009]. Durch derartige Änderungen kann es wiederum Veränderungen in Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur geben, welche dann Unterschiede in der Stabilität, der Bioaktivität oder Immunogenität bewirken können.

Druck

Proteine können während der Formulierung oder auch Applikation eventuell Druckschwankungen ausgesetzt sein. Allerdings sind diese Druckschwankungen wahrscheinlich viel zu gering, um eine merkliche Instabilität zu verursachen. Dennoch wurde in der Literatur berichtet, dass ein Druck von wenigen hundert Megapascal (MPa) ausreicht,

um die Bildung von entfalteten Intermediaten oder „molten globule“-Formationen (Tertiärstruktur ist zerstört, aber Sekundärstruktur ist noch intakt) zu erzeugen [Clery et al. 1995; Webb et al. 2001]. Die Entfaltung kommt deshalb zustande, weil bei hohem Druck das Volumen der entfalteten Protein-Solvens-Systeme geringer ist als das Volumen des nativen Zustandes [Wang 1999].

Sonstige Stresseinflüsse

Andere Stresseinflüsse auf das Protein können die Anwesenheit von Metallionen [Bauer et al. 1997], Salzen [Chan et al. 1996], Denaturantien [Timasheff 1993], der pH-Wert [Goto und Fink 1994], die Proteinkonzentration [Fields et al. 1992] oder Adsorptionen [Burke et al. 1992] sein. Viele dieser Faktoren gehören zu den Formulierungsparametern und können dementsprechend in einer Formulierung optimiert werden.

2.6 Aufkonzentrierung und Aufkonzentrierungstechniken

Hochkonzentrierte Antikörper-Lösungen (100 mg/ml) haben in den letzten Jahren einen Aufschwung erfahren. Immer häufiger wird die Forderung nach einer *i.m.* oder *s.c.* Injektion gestellt, welche durch die Formulierung von hochkonzentrierten Proteinlösungen erfüllt werden kann [Daugherty und Mrsny 2006]. Vorteil dieser Applikationsart ist, dass kein stationärer Aufenthalt oder Besuch eines Arztes mehr erfolgen muss, wie es bei den geringer konzentrierten Antikörper-Lösungen, welche *i.v.* als Infusion gegeben werden, bisher der Fall war. Da es sich bei den Indikationsgebieten der Antikörper-Therapien meist um chronische oder langwierige Erkrankungen handelt, ist eine Gabe des Arzneimittels zuhause ein erheblicher Vorteil. Die Lager- und Transportkosten sind außerdem bei geringeren Volumina nicht so hoch [Daugherty und Mrsny 2006]. Es gibt aber auch Nachteile, die gegen die Verwendung von hochkonzentrierten Antikörper-Lösungen sprechen. Es besteht z.B. eine erhöhte Gefahr der Immunogenität, da hochkonzentrierte Lösungen leicht zu Aggregation neigen [Fradkin et al. 2009].

Die Tangentialstromfiltration (TFF) ist der Goldstandard der Aufkonzentrierungstechniken für Proteine, da sie automatisierbar und für große Mengen geeignet ist und dabei reproduzierbare Ergebnisse liefert. Sie ist Industriestandard [Rosenberg et al. 2009]. Aus diesem Grund ist die TFF die favorisierte Methode, die in der Produktion angewandt wird. In der frühen Formulierungsentwicklung hingegen, in welcher nur wenig Probelösung für Formulierungsstudien zur Verfügung steht, sind andere Aufkonzentrierungstechniken, wie die

Zentrifugalkonzentratoren, Ultrafiltration mittels Rührzelle oder die Dialyse von Vorteil [Shire et al. 2004].

Hochkonzentrierte Proteinlösungen zeigen schnell Aggregation. Vor allem bei Einlagerungen bei erhöhten Temperaturen bilden hochkonzentrierte Proteinlösungen mehr Aggregate als gering konzentrierte. Was den mechanischen Stress angeht, kann allerdings ein gegenläufiges Ergebnis festgestellt werden. Hier verhalten sich hochkonzentrierte Lösungen meist stabiler, da prozentual weniger Proteine die Grenzfläche zu hydrophoben Oberflächen besetzen [Treuheit et al. 2002]. Die Techniken zum Aufkonzentrieren von Proteinen generieren aber selbst Stress und können somit unterschiedliche Qualitäten und Stabilitäten des aufkonzentrierten Proteins erzeugen [Shire et al. 2004].

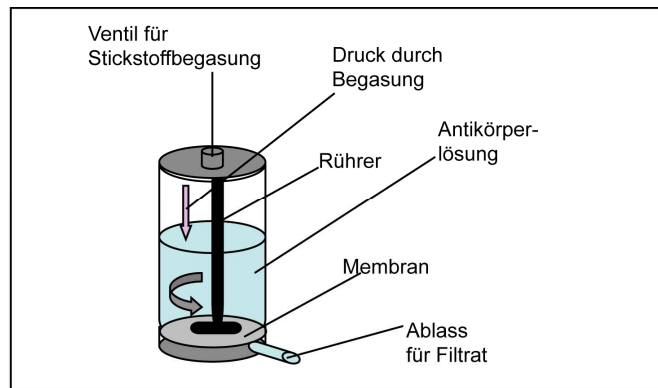
Rührzelle

Die Aufkonzentrierung in der Rührzelle ist eine Ultrafiltrationsmethode. Die Rührzelle (Abb. 2.6.1 A) besitzt ein Reservoir für die Proteinlösung, in dem ein magnetisches Rührstäbchen über einen Membranboden/Filterboden (z.B. aus regenerierter Zellulose) rührt. Die ganze Zelle wird mit Stickstoff unter Druck gesetzt, so dass die Proteinlösung durch die Membran filtriert wird. Dabei werden die Proteine von der Membran zurückgehalten und konzentrieren sich auf. Das Rühren verhindert ein Zusetzen der Membran und durchmischt die zurückgehaltene Lösung, damit keine „Dead-end“-Situation entsteht (Abb. 2.6.1 D1). Die Rührzelle ist zur Aufkonzentrierung, Diafiltration und zum Pufferaustausch für Makromoleküllösungen geeignet [Mahler et al. 2008; Wang et al. 2008a]. Es gibt verschiedene Größen (z.B. von 3-400 ml [Millipore Produktübersicht: Amicon Rührzelle 2010]), für die eine Reihe unterschiedlicher Membrantypen mit verschiedenen Ausschlussgrenzen erhältlich sind. Die Rührzelle ist auch als Einmalartikel, um Crosskontamination zu vermeiden, erhältlich [Pohl 1990].

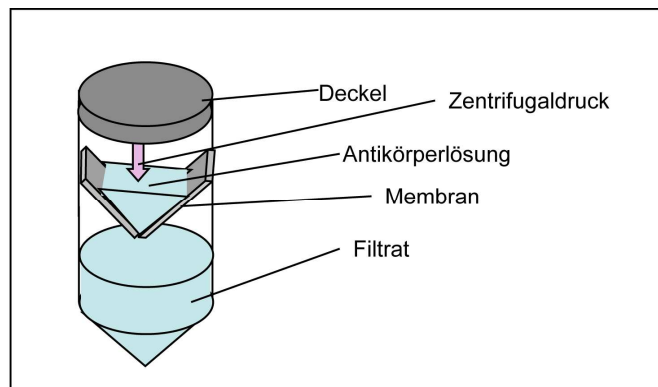
Zentrifugalkonzentratoren

Mittels Zentrifugation können in Röhrchen (Zentrifugalkonzentratoren), die für diese Zwecke eine Membran (z.B. aus regenerierter Zellulose) enthalten, Proteinlösungen aufkonzentriert werden (Abb. 2.6.1 B). Das Permeat wird während des Zentrifugierens auf Grund der Zentrifugalkraft durch die Membran gedrückt. Die größeren Proteine, die die Membran nicht passieren können, verbleiben im oberen Teil des Röhrchens und werden aufkonzentriert. Um auch hier eine „Dead-end“-Filtration (Abb. 2.6.1 D1) zu verhindern, sind die Membranen angeschrägt, so dass sie nicht komplett verblocken können.

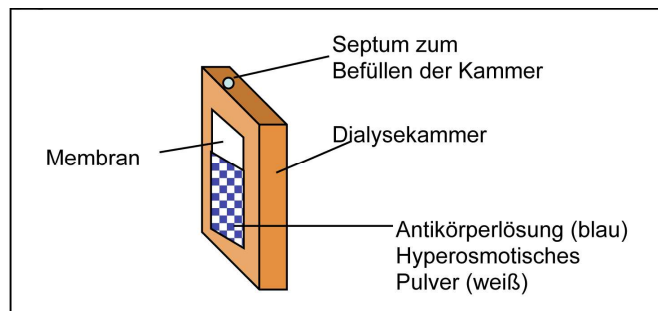
A



B



C



D

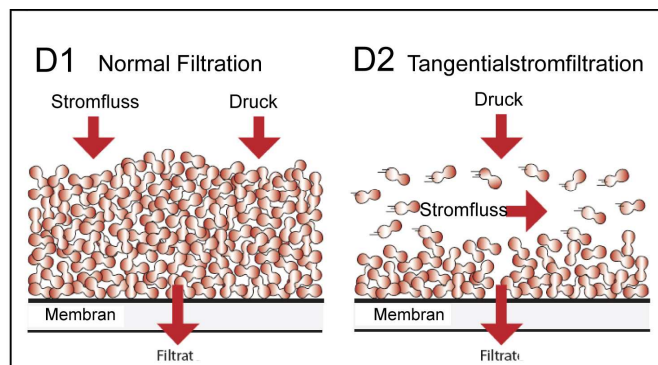


Abbildung 2.6.1 Verschiedene Aufkonzentrierungstechniken jeweils als Foto (links) und als Schemazeichnung (rechts) dargestellt. A: Amicon Rührzelle Modell 8050 von Millipore; B: Amicon-Ultra-15 Zentrifugeneinheiten von Millipore; C: Dialysekassette Slide-A-Lyzer von Thermo Scientific; D: TFF LabScale von Millipore (Bild von www.millipore.com); D1: Normalfiltration mit Verblockung der Membran [Rubin und Christy 2002]; D2: Funktionsprinzip der TFF [Rubin und Christy 2002]

Auch diese Systeme gibt es in verschiedenen Größen (z.B. 0,5 -70 ml [Millipore Produktübersicht: Amicon Zentrifugalkonzentratoren 2010]). Sie werden zum Aufkonzentrieren, Aufreinigen, Pufferaustausch und Entsalzen von Proteinlösungen verwendet. Teilweise sind auch Methoden beschrieben, die beispielsweise eine Kombination von TFF und Zentrifugation beinhalten [Russell et al. 2007]. Die Zentrifugation bietet den Vorteil, dass man auf minimale Volumina wie z.B. 0,2 ml reduzieren kann, während eine TFF (Labscale von Millipore) ein Totvolumen und damit ein Minimalvolumen von 13 ml besitzt.

Dialyse

Auch die Dialyse (Abb. 2.6.1 C) stellt eine Möglichkeit dar, Proteine aufzukonzentrieren [Shire et al. 2004]. Das Prinzip ist hier die Osmose [Saul und Don 1984]. Wenn eine hyperosmotische Lösung bzw. Pulver auf die Außenseite einer Dialysekammer gegeben wird, kann durch osmotischen Druck die Proteinlösung innerhalb der Membran aufkonzentriert werden, da das Solvens nach außen diffundiert. Es gibt ganz unterschiedliche Dialysesysteme in Form und Größe. Meist sind Dialysemembranen aus regenerierter Zellulose aufgebaut und können mit unterschiedlichsten Ausschlussgrenzen (z.B. von 2-20 kD) erhalten werden. Diese Systeme werden auch zum Aufreinigen, zum Pufferaustausch oder zum Isolieren von Proteinen verwendet.

Tangentialstromfiltration

Die Tangentialstromfiltration (Abb. 2.6.1. D, 2.6.2) ist eine membranbasierte Ultrafiltrationsmethode, bei welcher die Proteinlösung mit Hilfe einer Pumpe in einem Kreislauf an einer Membran entlang gepumpt wird. Durch Anlegen eines Druckes kann ein Druckabfall über die Membran generiert werden. Durch diesen Druckabfall findet neben dem Parallelstrom zu der Membran auch ein Strom durch die Membran statt (Abb. 2.6.1 D2). Da die Membran die Antikörper zurückhält, werden diese mit dem Parallelstrom mitgerissen und nur das Filtrat passiert die Membran. So wird ein Zusetzen der Membran, wie es häufig in der „Dead end“- Filtration oder Normalfiltration (Abb. 2.6.1 D1) stattfindet, verhindert und eine höhere Filtriergeschwindigkeit kann erreicht werden [Brose et al. 2002; Rubin und Christy 2002]. Die Tangentialstromfiltration wird auf Grund ihrer Art, nämlich mittels Druck und Überströmung über die Membran, auch häufig „cross-flow-filtration“ genannt (Abb. 2.6.2).

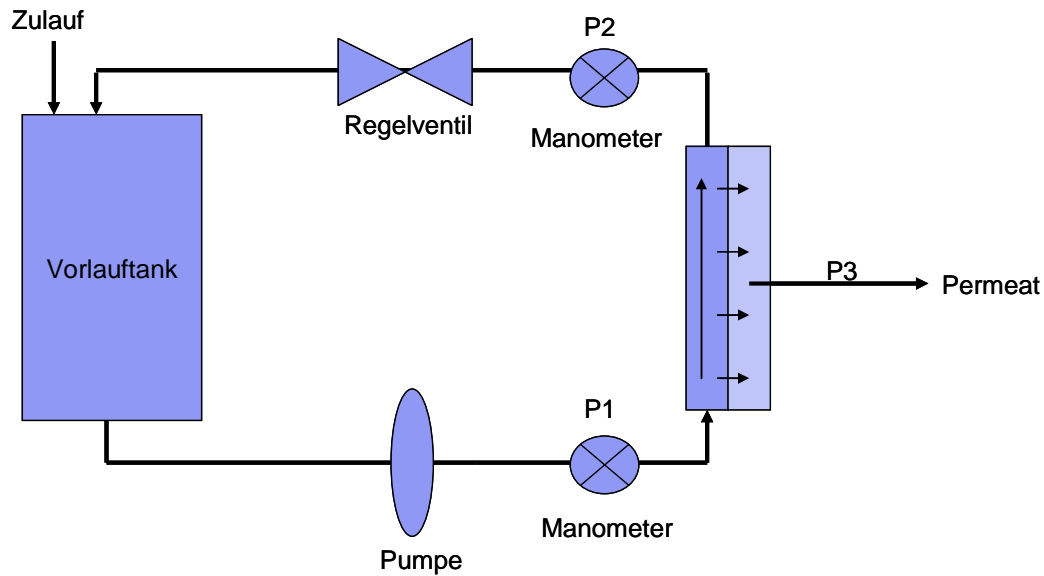


Abbildung 2.6.2 Schemazeichnung einer TFF mit Vorlauftank (Behälter, aus welchem das System gespeist wird und in den das Retentat zurückgeführt wird), Pumpe, Membran, Regelventil (zur Regelung des Volumenstromes) und zwei Manometern (zum Messen des Druckes vor und nach der Membran); AK-Lösung wird gegen den Uhrzeigersinn im Kreis gepumpt, Permeat wird durch Druckabfall an der Membran abfiltriert, dadurch Aufkonzentrierung des Antikörpers im System. P1: Druck am Eingang des Membranmoduls; P2: Druck am Ausgang des Membranmoduls; P3 Druck auf der Permeatseite

Über die Pumpgeschwindigkeit können die Drücke P1 und P2 eingestellt werden. Man nennt den Druck, der an der Membran herrscht, auch Transmembrandruck (*TMP*).

$$TMP[bar] = (P1 + P2) / 2$$

Der Druckverlust ist die Differenz zwischen dem Druck am Ein- und Ausgang des Membranmoduls.

$$\Delta P[bar] = P1 - P2$$

Neben den quantitativen Faktoren, die den Aufkonzentrierungsprozess beschreiben, sind natürlich vorzugsweise die verwendeten Prozessparameter für die Qualität und Stabilität des konzentrierten Proteins verantwortlich [Rosenberg et al. 2009]. Denn abhängig von den Prozessparametern erfährt das Protein einen entsprechend starken Scherstress und eine entsprechende Scherzeit. Es gibt zwei unterschiedliche Vorgehensweisen. Die eine zielt auf eine schnelle Aufkonzentrierung mit hoher Pumpleistung und hohen Druckintensitäten ab, so dass das Protein nur über eine kurze Zeit Stress ausgesetzt ist, aber eine hohe Scherung erfährt. Die andere Methode arbeitet mit wesentlich geringeren Pumpleistungen und Druckintensitäten, welche einen geringeren Stress für das Protein darstellen, das Protein

verweilt hier dafür wesentlich länger im System. Da sich im Vorlauftank ein Rührer befindet, kann sich auch das Scheren des Rührers bei längeren Aufkonzentrierungszeiten negativ auf die Stabilität des Proteins auswirken.

Im Allgemeinen sind die Prozessparameter der TFF sehr genau einstellbar und kontrollierbar, so dass eine reproduzierbare Aufkonzentration gewährleistet werden kann. Dies ist, neben der Möglichkeit, diese Technik im Großmaßstab zu betreiben, auch ein Grund für die Verwendung der TFF in der Produktion.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Monoklonale IgG-Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit monoklonalen IgG-Antikörpern gearbeitet. Die Bezugsquellen und Formulierungen sowie die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 3.1.1 zusammengestellt. Außerdem sind die wichtigsten Stoffgrößen der Lösungen, soweit sie gemessen wurden, angegeben. Die mit „Batch“ gekennzeichneten Lösungen wurden von Merck Serono bereitgestellt, die mit „Probelösung“ versehenen Lösungen wurden aus den „Batch“-Lösungen durch Aufkonzentrieren oder Verdünnen hergestellt. Die isoelektrischen Punkte der drei verwendeten Antikörper sind 8,3 für Cetuximab, 8,2 für EMD 72000 und 8,4 für Daclizumab. Die Werte wurden mittels IEF bestimmt.

3.1.2 Hilfsstoffe, Reagenzien, Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Hilfsstoffe, Reagenzien und Chemikalien sind in Tab. 3.1.2 mit den entsprechenden Reinheiten zusammengefasst.

3.1.3 Verpackungsmaterialien

Die in den Versuchen verwendeten Gefäße und Verschlüsse, die mit der Probelösung direkt in Kontakt kamen, sowie deren Dimensionen sind in Tabelle 3.1.3 aufgelistet.

Tabelle 3.1.1 Antikörperlösungen

Typ	Herstellung/ Bezugsquelle	Formulierung	Konz [mg /ml]	Hilfsstoffe	pH	Vis- kosität [mPas] ^a	Dichte [g*cm ⁻³] ^b	O.fl.sp. [mN/m] ^c
Cetuximab								
Batch (8,2 mg/ml)	von Merck Serono (Schweiz) bereit gestellt	Gepufferte Lösung	8,2	PBS-Puffer	7,2	-	-	-
Batch (2 mg/ml)	von Merck Serono (Schweiz) bereit gestellt	Gepufferte Lösung	2	PBS-Puffer	7,2	1,08 +/- 0,04	1,0078	52
Probe- lösung	aus Cetuximab Batch 8,2 mg/ml hergestellt ^d	Gepufferte Lösung	5	PBS-Puffer	7,2	1,19 +/- 0,12	1,0092	60
Probe- lösung	aus Cetuximab Batch 8,2 mg/ml hergestellt ^d	Gepufferte Lösung	5	PBS-Puffer; Polysorbat 80 (0,01/ 0,05 %)	7,2	-	-	-
Probe- lösung	aus Cetuximab Batch 2 mg/ml hergestellt ^e	Gepufferte Lösung	10	PBS-Puffer	7,2	1,67 +/- 0,14	-	-
Probe- lösung	aus Cetuximab Batch 2 mg/ml hergestellt ^e	Gepufferte Lösung	100	PBS-Puffer	7,2	5 +/- 0,24	-	-
Probe- lösung	aus Cetuximab Batch 2 mg/ml hergestellt ^e	Gepufferte Lösung	100	PBS-Puffer; Polysorbat 80 (0,01/ 0,05 %)	7,2	-	-	-
Markt- formu- lierung	von Merck Serono (Schweiz) bezogen	Erbitux [®]	5	Citrat-Puffer; Glycin; NaCl; Polysorbat 80 (0,01 %)	5,5	1,12 +/- 0,01	1,0105	43
EMD 72000								
Batch	von Merck Serono (Schweiz) bereit gestellt	Gepufferte Lösung	26,9	PBS-Puffer	7,2	-	-	-
Probe- lösung	aus EMD 72000 Batch hergestellt ^d	Gepufferte Lösung	2	PBS-Puffer	7,2	-	-	61
Probe- lösung	aus EMD 72000 Batch hergestellt ^d	Gepufferte Lösung	5	PBS-Puffer	7,2	-	-	56
Daclizumab								
Markt- formu- lierung	von Hoffmann- La Roche (Schweiz) bezogen	Zenapax [®]	5	PBS-Puffer; Polysorbat 80 (0,01 %)	6,9	-	-	-

^a Viskosität über Kegel-Platte-Rheometer bestimmt

^b Dichte über Biegeschwinger-Densitometer bestimmt

^c Oberflächenspannung über Ringtensiometer bestimmt

^d durch Verdünnen mit PBS-Puffer hergestellt

^e mittels TFF aufkonzentriert

Tabelle 3.1.2 Hilfsstoffe

Hilfsstoff	Hersteller	Reinheit
Acetonitril	Merck KGaA, Deutschland	zur Analyse; Reag. Pharm. Eur.; >99,9%
Beta Lactoglobulin A Isoelectric Focusing Marker®	Sigma-Aldrich Corp.; USA	
Bovine Serum Albumin Protein Standard (BSA)	Sigma-Aldrich Corp.; USA	
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Deutschland	zur Analyse; ACS, ISO, Reag. Pharm. Eur.; >99,5%
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Deutschland	Ph. Eur., BP, USP; >98,0%
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland	zur Analyse; ACS, ISO, Reag. Pharm. Eur.; >99,0%
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Merck KGaA, Deutschland	
Dulbecco's PBS-Puffer® (10x)	PAA Laboratories GmbH, Deutschland	ohne Calcium und Magnesium
Essigsäure (100%)	Merck KGaA, Deutschland	zur Analyse; ACS, ISO, Reag. Pharm. Eur.; >99,8%
Isopropanol	Merck KGaA, Deutschland	zur Analyse; ACS, ISO, Reag. Pharm. Eur.; >99,8%
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland	zur Analyse; ACS, ISO, Reag. Pharm. Eur.; >99,5%
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Deutschland	zur Analyse; Ph. Eur., BP, USP; >98,0%
Natriumperchlorat-Monohydrat	Merck KGaA, Deutschland	zur Analyse; >99,0%
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Deutschland	wasserfrei; >97,0%
Natronlauge 0,5 M	Merck KGaA, Deutschland	
Natronlauge 2 M	Merck KGaA, Deutschland	
Novex® Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x)	Invitrogen, USA	
Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x)	Invitrogen, USA	
Polysorbat 80	Merck KGaA, Deutschland	Ph. Eur., NF, JP
Protein Mixture	GE Healthcare; UK	
Salzsäure 1 M	Merck KGaA, Deutschland	
See Blue® Plus2 Prestained Standard (1x)	Invitrogen, USA	
Serva Blue R® (Coomassie)	Serva Electrophoresis; USA	
Spectra Gel Absorbent®	VWR; Deutschland	für die Konzentrierung von Proteinen und Micropartikel
Trichloressigsäure	Merck KGaA, Deutschland	zur Analyse; ACS, ISO, Reag. Pharm. Eur.; >99,5%
Gereinigtes Wasser (hergestellt mittels MilliQ-Anlage: Q-Pod Advantage; Millipore; USA)	frisch zubereitet	

Tabelle 3.1.3 Vialtypen und –größen

Vial	Hersteller Vial	Durchmesser [mm]	Höhe [mm]	Totales Füllvolumen [ml]	Stopfen	Hersteller Stopfen
0,8 ml HPLC Glasvials	VWR international GmbH; Deutschland	7,5	30	0,84	Silikon-Septum verbördelt mit Aluminium-Abdeckkappe	VWR international GmbH; Deutschland
1,5 ml HPLC Glasvials	VWR international GmbH; Deutschland	11	32	1,8	Polypropylen-Schraubdeckel mit Silikon-Septum	VWR international GmbH; Deutschland
2 ml Glasvials	Schott Rohrglas GmbH; Deutschland	16	35	3,9	Chlorbutyl-Gummi-Stopfen beschichtet mit Silikon und verbördelt mit Aluminium-Abdeckkappe	West Pharmaceutical Service; Deutschland
6 ml Glasvials	Schott Rohrglas GmbH; Deutschland	22	40	9,4	Chlorbutyl-Gummi-Stopfen beschichtet mit Silikon und verbördelt mit Aluminium-Abdeckkappe	West Pharmaceutical Service; Deutschland
50 ml Glasvials	Schott Rohrglas GmbH; Deutschland	40	73	64	Chlorbutyl-Gummi-Stopfen beschichtet mit Silikon und verbördelt mit Aluminium-Abdeckkappe	West Pharmaceutical Service; Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Proben

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörperlösungen mit Cetuximab (Tab. 3.1.1) wurden jeweils aus einem „Batch“ mit einer Konzentration von 8,2 mg/ml oder 2 mg/ml hergestellt. Die Antikörperlösungen mit EMD 72000 wurden aus einem „Batch“ mit einer Konzentration von 26,9 mg/ml Antikörper hergestellt. Wie in Tab. 3.1.1 angegeben wurden die Antikörperlösungen ausgehend von dem jeweiligen „Batch“ auf die entsprechenden Konzentrationen mit PBS-Puffer (Dulbecco’s PBS verdünnt mit gereinigtem Wasser) verdünnt oder mittels TFF (TFF Labscale, Millipore, USA) aufkonzentriert. Der pH-Wert des PBS-Puffers wurde zuvor (mit NaOH oder HCl) auf den pH der Formulierung eingestellt und nach Verdünnung oder Aufkonzentrierung nochmals überprüft. Das verwendete Wasser wurde über eine MilliQ-Anlage (Q-Pod Advantage, Millipore, USA) mit nachgeschaltetem Sterilfiltrieren (Millipak Express®, Millipore, USA) erzeugt. Das zugesetzte Tween 80 (Polysorbat 80) wurde zunächst als Stammlösung mit 1% Tween 80 in PBS-Puffer (Dulbecco’s PBS verdünnt mit gereinigtem Wasser; pH der Endformulierung) hergestellt und

danach entsprechend der in der Formulierung angegebenen Endkonzentration anteilmäßig (% als m/v) zugesetzt. Die beiden verwendeten Marktformulierungen sowie Cetuximab mit 2 mg/ml wurden in ihrer Formulierung (Tab. 3.1.1) bezogen und auch so verwendet.

Die Proben für die Stressversuche wurden aseptisch unter der LAF-Bank (Hera Safe, Thermo Electron Corporation, USA) hergestellt. Dazu wurden alle verwendeten Lösungen (Antikörperlösung, Puffer, Tweenlösung) zuerst mit einem Spritzenvorsatzfilter aus Polyethersulfon (PES) mit einer Porengröße von 0,2 µm (Millex GP, 33 mm, Millipore, USA) in sterile Bechergläser filtriert und danach entsprechend der gewünschten Formulierung zusammengemischt. Die fertigen Lösungen wurden mit einer Multipette stream (Eppendorf, Deutschland) aus dem Becherglas in die Vials abgefüllt (Tab 3.1.3). Die Vials ebenso wie die dazugehörigen Stopfen wurden im Vorfeld in einer Labor-Spülmaschine (Miele Professional G7836CD, Miele & Cie. KG, Deutschland) mit VE-Wasser gewaschen und danach in Papiertüten autoklaviert (Autoklav: Tuttnauer steam sterilizer 3850ELV, Tuttnauer, USA), welche erst unter der LAF-Bank wieder geöffnet wurden. Nachdem die Vials mit der Probelösung befüllt worden waren, wurden sie mit einer sterilen Pinzette mit den Gummistopfen verschlossen. Nach dem Verschließen der Vials wurden sie aus der LAF-Bank herausgenommen und mit der halbautomatischen Bördelmaschine HV 100B (Bausch + Ströbel, Deutschland) verbördelt.

Für die Rührversuche wurden vor dem Verschließen die ebenfalls autoklavierten Magnetrührstäbchen mit einer Pinzette in das Vial gegeben. Für den Scherversuch (Kapitel 4.2.2) wurden die Vials ohne Luft gefüllt. Dazu wurde vor Aufsetzen des Stopfens das Vial bis zum Überlaufen mit Antikörperlösung gefüllt und eine Kanüle 18G (Sterican, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) in den Stopfen gesteckt. Dann wurde der Stopfen aufgesetzt und die durch ihn verdrängte Lösung konnte durch die Kanüle nach außen abfließen. Danach wurde die Kanüle vorsichtig entnommen, so dass ein komplett gefülltes Vial ohne Lufteinschluss resultierte.

Die Ausgangsproben mit 10 mg/ml Cetuximab für die Aufkonzentrierungsversuche (Kapitel 4.3.3) wurden ebenfalls, wie oben beschrieben, unter der LAF-Bank hergestellt, allerdings nicht in Vials abgefüllt, sondern über eine Vakuumfiltrationseinheit (Bottle-Top-Filter, Nalgene, Thermo Fischer Scientific Inc., USA) mit einer PES-Membran (0,2 µm Porengröße) direkt in eine sterile Plastikflasche filtriert. Aus diesem Vorrat wurde dann für die entsprechenden Aufkonzentrierungsversuche die Antikörperlösung entnommen.

Für den Machbarkeitsversuch der Aufkonzentrierung (Kapitel 4.3.3) wurden die hochkonzentrierten Lösungen nicht steril filtriert, da die Lösungen visuell und turbidimetrisch auf Aggregate untersucht werden sollten.

Es wurden immer mindestens Dreifach-Messungen gemacht. Die angegebenen Fehlerbalken in den Grafiken stellen die Standardabweichungen dar.

3.2.2 Stressmethoden

3.2.2.1 Schüttelstress

Der Schüttelstress wurde mit einem Edmund-Bühler-Schüttler SM30 (Edmund Bühler GmbH, Deutschland) erzeugt (Abb. 3.1.1). Der Schüttler führt eine Rechts-Links-Bewegung mit einer Amplitude von 3 cm aus. Die Bewegung kann mit einer Sinuskurve entlang einer optischen Achse beschrieben werden.

Es wurden jeweils 3 Vials einer Versuchsprobe pro Entnahmezeitpunkt horizontal in den Schüttler eingespannt, geschüttelt und nach verschiedenen Stresszeiten entnommen. Die Stresszeiten betrugen 0, 5, 24, 48 und 120 Stunden. Auch Triplets der Placebos wurden dementsprechend gestresst und anschließend untersucht. Die Schüttelintensitäten variierten von 150 über 200 oder 250 bis zu 300 „Umdrehungen pro Minute“ (U/min). Der Schüttler wurde so platziert, dass die Vials keiner direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren. Die Versuche wurden üblicherweise in einem Labor mit einer überprüften Raumtemperatur (RT) von $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Für temperaturabhängige Versuche wurde der Schüttler in verschiedene Klimakammern mit kontrollierten Temperaturen von 4°C , 25°C und $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ gestellt. Die verwendeten Vials (Maße und Materialien in Tab. 3.1.3) und jeweiligen Füllmengen sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil aufgeführt.

Für den Schüttelstress wurden verschiedene Parameterkombinationen getestet. Sie unterschieden sich in der Schüttelfrequenz, Schüttelzeit, Temperatur, Füllmenge der Vials, Vialtyp und -größe wie aber auch durch zugesetzte Stabilisatoren und unterschiedliche Antikörper sowie Konzentrationen. Die Kombinationen der Parameter sind an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil aufgelistet.

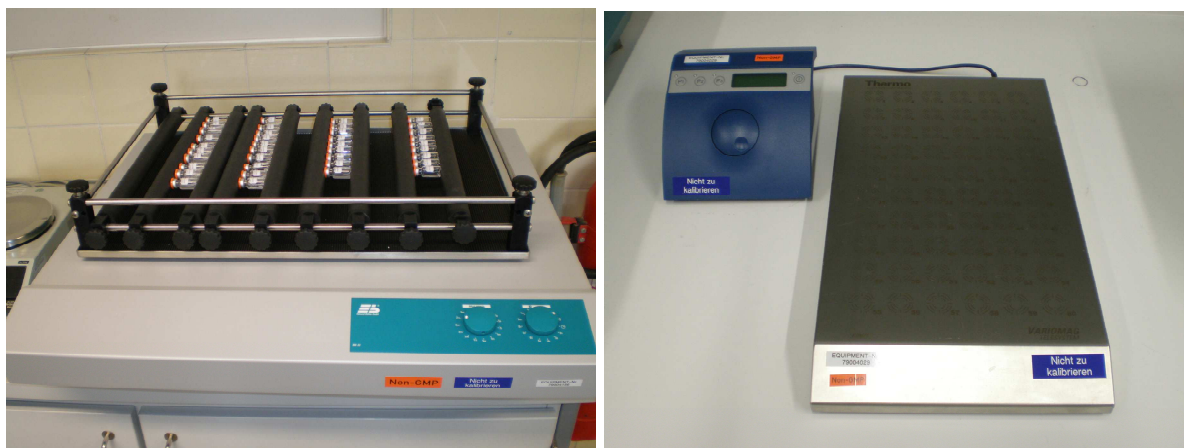


Abbildung 3.1.1 Links Schüttler Edmund Bühler SM30 mit eingespannten Vials; rechts Rührplatte Variomag Telesystem

3.2.2.2 Rührstress

Versuche zum Rührstress wurden (in Zusammenarbeit mit Merck Serono Pharmaziepraktikantin Silke Simon) auf einer Rührplatte mit 60 Rührpositionen (Variomag Telesystem 60 Position mit Telemodul 40C, Thermo Fischer Scientific Inc., USA) durchgeführt (Abb. 3.1.1). Für die Versuche wurden zylindrische Magnetrührstäbchen der Größe 8 x 3 mm (Kapitel 4.1.1) oder 12 x 4,5 mm (Kapitel 4.2.2) aus Polytetrafluorethylen (PTFE) (VWR international GmbH, Deutschland) in die mit Probelösung gefüllten Vials gegeben, verschlossen und auf der Rührplatte gerührt. Die Rührgeschwindigkeiten betrugen 100, 120 oder 160 Umdrehungen pro Minute (U/min). Nach 0, 5, 24, 48 (Kapitel 4.1.1) oder auch 72 Stunden (Kapitel 4.2.2) wurden die Vials (immer Triplets) entnommen, geöffnet und deren Inhalt untersucht. Die Rührplatte befand sich während der Versuche in einem Labor mit ermittelten $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ Raumtemperatur (RT), nur für den Temperaturversuch wurde die Rührplatte in den Kühlschrank (Liebherr Profiline, Liebherr, Deutschland) mit kontrollierten $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ gestellt. Drei Vials pro Lösung und pro Stresszeit wurden untersucht. Die Durchführung der Befüllung der Vials wurde bereits unter 3.2.1 beschrieben.

In dieser Arbeit wurde das Rühren mit unterschiedlichen Parameterkombinationen durchgeführt, die sich in Vialgröße, Füllmenge der Vials, Rührgeschwindigkeit, Rührzeit und Temperatur unterschieden. Die genauen Parameterkombinationen sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil aufgeführt.

3.2.2.3 Luft-Wasser-Grenzflächenstress (LWG-Stress)

Der Luft-Wasser-Grenzflächenstress wurde mit Druckluft erzeugt, welche mit einem Druck von 1 bar und einer Flussrate von 60 Liter pro Stunde in 6 parallel begaste 50 ml-Vials

(3 Vials pro Formulierung) eingeleitet wurde (Abb. 4.2.7). Die sechs 50 ml-Vials, die parallel begast wurden, erfuhren alle einen gleichmäßigen Luftstrom (10 l/h* Vial). Um den Druck und die Flussrate zu kontrollieren, wurde ein Druckminderer (0-16 bar LR-D-Mini, Festo, Deutschland) mit nachgeschaltetem Gaszähler (0-95 l/h, Rota Wehr) zwischen den mit Haus-Druckluft versorgten Drucklufthahn und den Schlauch, der zu den Proben führte, geschaltet. Die Temperatur betrug $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Die Vials waren mit 50 ml Cetuximab-Lösung (PBS, 5 mg/ml) gefüllt. Drei von ihnen enthielten zusätzlich noch 0,01% Tween 80. Die Vials waren mit den dazugehörigen Gummi-Stopfen verschlossen. In die Gummistopfen waren zuvor per Hand Löcher für die Begasungsschläuche herausgeschnitten worden. Da der Gummi der Stopfen luftdicht mit den Begasungsschläuchen abschloss, wurde in jedes Vial eine Kanüle 18G (Sterican, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) gestochen, um einen Druckausgleich zu ermöglichen. Die mit der Probelösung in Kontakt kommenden Enden des Begasungsschlauches bestanden aus Teflon (Durchmesser des Schlauches 1 mm). Dieses Material ist härter und gewährleistete einen konstanteren Luftstrom als die weichen Silikonschläuche, die oberhalb des Teflonendes verwendet wurden. Nach 0, 5, 24, 48 und 72 Stunden Begasungszeit wurden aus jedem Vial 7,5 ml Probelösung entnommen und in 6 ml-Vials umgefüllt, um später analysiert zu werden. Jeweils nach der Entnahme der Probe wurde die neue Füllmenge in den 50 ml-Vials mit einem Strich an der Glaswand dokumentiert, so dass verdunstetes Wasser nach 24 Stunden wieder bis zum Strich ergänzt werden konnte. Es wurden immer Triplets gestresst und auch zu jedem Zeitpunkt Triplets entnommen.

3.2.2.4 Wärmestress

Versuche mittels Wärmestress wurden in kontrollierten Klimakammern bei 4°C , 25°C und $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Für den Stabilitätsversuch in Kapitel 4.3.3 wurden in den drei Klimakammern jeweils drei 2 ml-Vials mit Proben, die durch die vier verschiedenen Aufkonzentrierungstechniken gewonnen worden waren, für 8 Wochen eingelagert. Die Vials waren mit 0,7 ml Cetuximab-Lösung (PBS, 100 mg/ml) gefüllt.

Für den Schüttelversuch in Kapitel 4.1.2, der in Zusammenarbeit mit Merck Serono Pharmaziepraktikant Sebastian Schmidt durchgeführt wurde, wurde der Schüttler (SM30 Edmund Bühler) für 120 Stunden jeweils in die entsprechende Klimakammer gestellt. Hier wurden ebenfalls 2 ml-Vials verwendet. Drei Vials pro Stresszeit waren mit 1 ml Cetuximab (PBS, 5 mg/ml) und ebenfalls drei Vials mit 1 ml Marktformulierung Erbitux gefüllt. Die Proben wurden 0, 5, 24, 48 und 120 Stunden lang geschüttelt und dann entnommen. Drei ungeschüttelte Vials wurden jeweils nach 0, 24 und 120 Stunden als Kontrolle entnommen.

Drei Placebos je Formulierung (Placebo Marktformulierung und PBS-Puffer) wurden geschüttelt und ungeschüttelt zusätzlich 120 Stunden in der Kammer gestresst.

3.2.3 Analytische Methoden

3.2.3.1 Visuelle Kontrolle

Die Prüfung auf Partikelkontamination - sichtbare Partikel, Präzipitate - erfolgte gemäß der Vorschrift Ph.Eur. 2.9.20. [Europäisches Arzneibuch 6.0 2008c]. Die Probelösungen wurden direkt nach Beendigung der Stresszeiten in den Ausgangsvials visuell untersucht. Unter einer Weißlichtquelle vor einem schwarzen und weißen Hintergrund wurden die Lösungen nach Trübung, Partikel und Verfärbungen im Vergleich zu Startvials vor der Stressung qualitativ begutachtet. Mit Hilfe einer Kaltlichtquelle (KL 1500 electronoc, SchottAG, Deutschland) wurde die Lösung außerdem auf Opaleszenz untersucht. Zur Dokumentation wurden die Vials fotografiert.

„Weißes“ Licht, sowie der konzentrierte Lichtstrahl der Kaltlichtquelle führen bei Anwesenheit genügend großer Partikel zum optischen Effekt der Lichtstreuung. Der Tyndall-Effekt macht über Rayleigh-Streuung opaleszent erscheinende Strukturen ab einer Größe von etwa 20 nm sichtbar. Sie erscheinen bläulich schimmernd. Der größere Anteil roten Lichtes, der bei der Streuung größerer Partikel auftritt, und den Tyndall-Effekt heller, gelblicher erscheinen lässt, ist eine Folge der Mie-Streuung. Beide Effekte ermöglichen eine visuelle Begutachtung und Aussage über die Zunahme der Trübung [Eisenberg et al. 1977].

3.2.3.2 Trübungsmessung über Absorptions-Spektroskopie bei 350 nm

Mit Hilfe einer Absorptionsmessung der Lösung bei 350 nm können unlösliche Aggregate auf Grund ihrer Lichtstreuung gemessen werden [Eckhardt et al. 1994]. Diese Methode stellt eine gute „small scale“ Technik dar, die im Vergleich zu Lichtblockade-Messungen nur wenig Probenvolumen benötigt.

Trübungsmessungen für die Rühr- und Schüttelversuche (Kapitel 4.1.1, 4.1.2) wurden an einem Cary 50 UV/VIS-Spektrophotometer (Varian Inc., USA) durchgeführt. Es wurden Quarzglas-Küvetten mit 15 mm Zentrumshöhe und einer Schichtdicke von 10 mm (105.201QS, Hellma GmbH & CoKG, Deutschland) verwendet. Die Küvetten wurden zwischen allen Messungen mit gereinigtem Wasser und Ethanol gespült und getrocknet. Die Probelösungen wurden bei 350 nm unverdünnt jeweils dreimal gegen Wasser gemessen und davon der Mittelwert gebildet. Außerdem wurden Placebos vermessen, für die folgende Absorptionswerte erhalten wurden: 0,001 für PBS-Puffer (pH 7,2), 0,0019 PBS-Puffer mit

0,01% Tween 80 (pH 6,9/ pH 7,2) und 0,0018 für Citrat-Puffer mit Glycin und 0,01% Tween 80 (pH 5,5). Die Vermessung einer Verdünnungsreihe, ausgehend von einer Formazinlösung, bestätigte einen bis zu einer Absorption von 2 nahezu linearen Verlauf der Absorption gegen die Trübung (Anhang A1, Abb. A.1). Absorptionswerte, die höher als 2 liegen, sollten aus diesem Grund unter Vorbehalt betrachtet werden.

Für die Schüttelstressversuche mit hochkonzentrierten Antikörperlösungen (Kapitel 4.3.1, Kapitel 4.3.2) wurden UV-Kunststoffküvetten mit ebenfalls 15 mm Zentrumshöhe und 10 mm Schichtdicke (Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland) benutzt. Am Cary 50 UV/VIS-Spektrophotometer (Varian Inc., USA) wurden bei 350 nm in einer Küvette jeweils drei Messungen der unverdünnten Probelösung gegen Placebo durchgeführt und davon der Mittelwert genommen.

Messungen zu den Aufkonzentrierungsversuchen (Kapitel 4.3.3) ebenso wie den Scherstress- und Luft-Wasser-Grenzflächenstressversuchen (Kapitel 4.2.2) wurden an dem UV/VIS-Spektrophotometer NanoPhotometer™ von Implen (Implen GmbH, München, Deutschland) gemacht. Hierzu wurden ebenfalls die Einmalküvetten von Brand mit 15 mm Zentrumshöhe und 10 mm Schichtdicke verwendet. Es wurde gegen Placebo ein Nullabgleich durchgeführt und anschließend die unverdünnte Probelösung 3-mal in einer Küvette bei 350 nm gemessen und der Mittelwert gebildet.

3.2.3.3 Konzentrationsmessung über Absorptions-Spektroskopie bei 280 nm

Bei 280 nm absorbieren die Tryptophan und Tyrosinreste der Proteine, daher ist dies die Wellenlänge, bei der man über eine UV/VIS-spektroskopische Messung die Konzentration des vorliegenden Proteins bestimmen kann. Da die Konzentrationsmessung durch Trübung oder Verunreinigungen verfälscht werden kann, wird zusätzlich bei 320 nm^a gemessen und dieser Wert wird von der Absorption bei 280 nm abgezogen [Eckhardt et al. 1994].

Die Konzentrationsmessungen wurden wie auch schon die Trübungsmessungen für die Versuche an unterschiedlichen Geräten und mit unterschiedlichen Küvetten durchgeführt.

Für die Rühr- und Schüttelversuche (Kapitel 4.1.1, 4.1.2) wurde das Cary 50 UV/VIS-Spektrophotometer (Varian Inc., USA) verwendet. Hier wurde in Quarzglas-Küvetten mit 15 mm Zentrumshöhe und einer Schichtdicke von 10 mm (105.201QS, Hellma GmbH & Co KG, Deutschland) gemessen. Die Antikörper-Proben wurden zuvor so verdünnt, dass der ermittelte Absorptionswert im Lambert-Beerschen-Bereich von 0,1 - 0,8 lag.

^a interne Teilprüfanweisung Merck Serono

Der Proteingehalt kann dann bei gegebenem Extinktionskoeffizient des Proteins nach Lambert-Beer mit folgender Formel berechnet werden:

$$c = \frac{A_{280} F}{\epsilon d}$$

c Proteingehalt (mg/ml)

A_{280} Absorption der Probe bei 280 nm

ϵ spezifischer Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm
(Cetuximab = 1,4 cm²/mg)^a

d Schichtdicke der Küvette in cm (1cm)

F Verdünnungsfaktor der Probe

^a interne Teilprüfanweisung Merck Serono

Ebenso wurde für die Schüttelstressversuche mit hochkonzentrierten Antikörper-Lösungen (Kapitel 4.3.1, 4.3.2) verfahren. Lediglich die eingesetzten Küvetten waren andere, es waren hier wie für die Trübungsmessungen UV-Kunststoffküvetten mit 15 mm Zentrumshöhe und 10 mm Schichtdicke (Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland). Für die Aufkonzentrierungsversuche (Kapitel 4.3.3) wie auch für die Scherstress und Luft-Wasser-Grenzflächenstressversuche (Kapitel 4.2.2) wurde das UV/VIS-Spektrophotometer NanoPhotometer™ von Implen (Implen GmbH, München, Deutschland) verwendet. Die Küvetten wurden hier durch die faseroptische Mikromesszelle „Tray Cell“ (Hellma GmbH & Co. KG, Deutschland) ersetzt. Die faseroptischen Lichtleiter leiten das UV/VIS-Licht des Photometers zu der Spitze der Küvette, dort befindet sich die Probe. Der Deckel gibt die Schichtdicke vor. An der Oberseite des Deckels befindet sich ein Spiegel, so dass das Licht entsprechend durch die Probe zurückgeworfen und über die faseroptischen Lichtleiter wieder in das Photometer geleitet wird. Dort kann dann die Absorption bei gegebener Wellenlänge abgelesen werden. Aufgrund der extrem schmalen Schichtdicken der Deckel von 1, 0,2 und 0,1 mm ist es möglich, die Proben unverdünnt zu messen und damit Verdünnungsfehler zu vermeiden. Das geringe Probenvolumen von 0,7 - 5 µl ist ein weiterer Vorteil dieser Küvette. Bei Lösungen mit Konzentrationen höher als 50 mg/ml wurden die Lösungen 20-mal gemessen, da bei sehr geringer Schichtdicke häufig Ausreißer detektiert werden konnten. Als Ursache dafür könnten Luftbläschen oder Staub in Frage kommen.

3.2.3.4 Lichtmikroskopie

Die Mikroskopie wurde hier als qualitatives bildgebendes Verfahren angewandt, das die Unterschiede der Proteinaggregate hinsichtlich Größe und Form darstellt.

Zur mikroskopischen Analyse wurden die unverdünnten Proben mit einer Einmalpipette auf einen Objektträger übertragen und unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX60, Olympus GmbH, Deutschland) betrachtet. Die Vergrößerung des Okulars betrug 10x und die des verwendeten Objektivs ebenfalls 10x. Somit resultierte eine Vergrößerung von 100x. Mit einer aufgesetzten Kamera (Sanyo color CCD, Sanyo Electric Co., Ltd., Japan) wurden die Proben dokumentiert.

3.2.3.5 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde in dieser Arbeit durchgeführt, um lösliche Aggregate und die Abnahme des Monomergehaltes zu detektieren. Dazu wurden die Proben zunächst auf 2 oder 5 mg/ml mit dem entsprechenden Placebo verdünnt. Um unlösliche Präzipitate abzutrennen, wurden die Proben danach in einer Zentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland) 3 min bei 800 U/min zentrifugiert. Es wurden pro Lauf 100 µg des Antikörpers (20 µl der 5 mg/ml Lösung; 50 µl der 2 mg/ml Lösung) injiziert. Die Analyse wurde an einer Merck-Hitachi HPLC Anlage mit den Bauteilen Interface (D7000 Interface), UV-Detektor (L7400 UV-Detector), zwei Pumpen (L6000 A Pump und L6200 Intelligent Pump) und programmierbarer Autosampler (L7250 Autosampler) mit zugehöriger Kühlvorrichtung (Sample-Cooler) durchgeführt. Über den Verlauf der Analyse wurden die Proben auf 11°C im Autosampler gekühlt und gelagert. Als Säule diente eine TSK-Gel G3000SWXL Säule mit 7,8 mm ID x 30,0 cm L (Tosoh Bioscience GmbH, Deutschland). Es wurde das Fließmittel 0,4 M NaClO₄, 0,05 M NaPO₄ Puffer (pH 7,2) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min verwendet. Das Eluat wurde im UV-Detektor bei 280 nm gemessen und das Ergebnis aufgezeichnet. Mit der HPLC-Software EZChrom Elite Client, Version 3.0 (Scientific Software International Inc., USA) konnten die Chromatogramme hinsichtlich der Peakflächen („Area under the curve“, AUC) ausgewertet werden. Der Aggregatgehalt und der Gehalt an Degradationsprodukten werden als Prozentangabe dargestellt. Dabei ergeben alle detektierten Peakflächen eines Laufes zusammen 100% und der Gehalt an Aggregaten und Degradationsprodukten wird anteilig ausgerechnet. Der Monomergehalt wurde nicht mit dieser 100%-Methode bestimmt, sondern über die absoluten Peakflächen des Monomers. Als Vergleich lief in jeder Sequenz eine Startprobe mit, die nicht gestresst wurde. Eine Kalibrierung war somit nicht notwendig. Diese Methode hat den Vorteil, dass über eine absolute Abnahme des Monomergehaltes indirekt auch die Bildung von großen Aggregaten (nicht in SEC detektierbar) detektiert werden kann. Placebos der Antikörperlösungen wurden ebenfalls getestet. Auftretende Peaks durch Hilfsstoffe wurden dann entsprechend in den

Antikörper-Chromatogrammen nicht berücksichtigt (z.B. Citrat-Peak). Ein Gel-Filtrations-Standard (Gel Filtration Standard®, Invitrogen, USA) wurde außerdem am Anfang und am Ende einer Sequenz injiziert, um die Zuverlässigkeit und Trennleistung des Systems sicherzustellen.

3.2.3.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde verwendet, um kovalente Aggregate und Bruchstücke vor und nach Reduktion ausfindig zu machen. Die Antikörperlösungen wurden auf 2 mg/ml mit entsprechendem Placebo verdünnt und vorab wie bei der Größenausschlusschromatographie zentrifugiert, um unlösliche Präzipitate abzutrennen. Für die Untersuchung an den nicht reduzierten Proben wurden 20 µl Probe (2mg/ml); 50 µl Sample Buffer (Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x), Invitrogen, USA) und 30 µl gereinigtes Wasser zusammengegeben. Für die reduzierten Proben wurde anstelle von 30 µl gereinigtem Wasser 20 µl und 10 µl DTT (100 mg/ml, 1,4-Dithiotreitol, Merck KGaA, Deutschland) verwendet. Danach wurden sowohl die reduzierten wie auch die nicht reduzierten Proben auf einem Vortexer (Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA) gemischt und anschließend auf einem Heizblock (VWR Heizblock, VWR international GmbH, Deutschland) bei 95°C 4 min lang erhitzt. Vergleichsproben ohne Antikörper wurden ebenso behandelt. Die Färbekontrolle bestand aus 10 µl BSA (0,4 mg/ml; Protein Standard, Sigma-Aldrich Inc., USA), 190 µl gereinigtem Wasser und 200 µl Sample Buffer. Die vorbereiteten Lösungen wurden zu je 10 µl in die Taschen der Gele, ein reduziertes und ein nicht reduziertes (4-20% Tris-Glycine Gel 1,0 mm x 12 well, Invitrogen, USA) pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde der SDS Marker SeeBlue Plus2 (Invitrogen, USA) verwendet und unverdünnt, analog den Proben auf Position 1 und 12 des Gels aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 300 Volt, 40 Milliampere und 25 Watt. Die Laufzeit betrug ca. 45 min und als Spannungsquelle diente der Power Ease 500 (Invitrogen, USA). Nach Beendigung der Laufzeit wurden die Gele aus ihren Plastikhüllen befreit und in einer Fixierlösung, bestehend aus 400 ml Ethanol, 520 ml gereinigtem Wasser und 80 ml Essigsäure 100%, 10 min fixiert. Danach wurden die Gele 1 h in gereinigtem Wasser gewaschen und dann 30 min in der Färbelösung (hergestellt aus 1 g Coomassie (Serva Blue R) gelöst in 450 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure 100%, 450 ml MilliQ-Wasser) gefärbt. Entfärbt wurden die Gele anschließend in einer Entfärbelösung mit 1340 ml gereinigtem Wasser, 160 ml Essigsäure 100% und 500 ml Ethanol, bis die gewünschte Helligkeit des Geles erreicht war. Diese Entfärbung war nach zweimaligem Wechseln (nach 15 und 45 min) der Lösung meist nach 105 min erreicht. Schließlich wurden die Gele in der

Konservierungslösung (Gel-DryTM Drying solution, Invitrogen, USA) noch 20 min konserviert und dann zwischen 2 Cellophanfolien (DryEase Mini Cellophane, Invitrogen, USA) in einem Rahmen zum Trocknen aufgestellt. Die Gele wurden in getrocknetem Zustand eingescannt (Personal Densitometer SI, Amersham Biosciences, Deutschland) und mit der Software AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Version 4.19.029, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Deutschland) ausgewertet. Anhand der zugesetzten Marker auf Position 1 und 12 des Gels konnten die Molekulargewichte der Proteinbanden berechnet werden, welche in dieser Arbeit allerdings nicht aufgeführt werden. Vielmehr sind die prozentualen AUCs der einzelnen Banden einer Probe dargestellt.

3.2.3.7 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wird als Identitätsmethode für Proteine verwendet. Durch Verschiebung oder Änderung des Bandenmusters sind chemische Instabilitäten wie beispielsweise Deamidierungen zu erkennen [Bischoff und Kolbe 1994; Reubsæet et al. 1998a].

Auch hier wurden wie für die SDS-PAGE die Proben zunächst auf 2 mg/ml verdünnt, wenn sie nicht schon in dieser Konzentration vorlagen und dann nach folgendem Verlauf entsalzt. 40 µl Probelösung wurden in einem Zentrifugalkonzentratorröhrchen (Microcon Centrifugal Filter, Ultracel YM-30, reg. Zellulose, Millipore, USA) vorgelegt, 360 µl gereinigtes Wasser mit einer Pipette vorsichtig zugegeben und 12 min bei 8000 U/min zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland). Die Antikörper-Lösung wurde danach noch einmal mit 200 µl gereinigtem Wasser gespült und erneut ca. 5 min bei 8000 U/min auf ein Volumen von ca. 20 µl reduziert. Die aufkonzentrierte Antikörper-Lösung wurde danach in ein Eppendorfgefäß überführt und mit gereinigtem Wasser, mit welchem zuvor das Zentrifugalkonzentratorröhrchen gespült wurde, auf 40 µl aufgefüllt. Die so vorbereiteten Proben wurden zu je 10 µl mittels eines Dosierstreifens mittig auf das Gel (IsoGel Agarose IEF Plates, pH range 3-10, Lonza, Rockland, USA) aufpipettiert. Außerdem wurde eine Färbekontrolle (Beta-Lactoglobulin, Isoelectric Focusing Marker, Sigma-Aldrich Inc., USA) zu 4 mg/ml aufgetragen. Besagtes Gel wurde zu Vermeidung von temperaturabhängigen Migrationen auf einer Kühlplatte positioniert, dabei wurde darauf geachtet, dass es luftblasenfrei liegt. Links und rechts an den Rand des Gels wurde jeweils ein mit 1 ml Anoden- (0,5 M Essigsäure) bzw. Kathodenflüssigkeit (0,5 M Natronlauge) getränkter Streifen gelegt. Als pI-Marker wurde eine Protein-Mixtur (Isoelectric Focusing Calibration Kit, High Range pH 5-10,5; GE Healthcare, USA) verwendet und unverdünnt, analog den

Proben auf Position 1 und 11 des Gels aufgetragen. Die elektrophoretische Fokussierung erfolgte bei 1000 Volt, 25 Milliampere und 15 Watt. Die Laufzeit betrug 75 Minuten und als Spannungsquelle diente der Blue Power 3000 (Serva Elektrophoresis, Heidelberg, Deutschland).

Nach Beendigung der Fokussierung wurde das Gel direkt für 10 min in die Fixierlösung bestehend aus Trichloressigsäure und gereinigtem Wasser (75 ml Trichloressigsäure-Stammlösung mit 1 g/ml + 425 ml gereinigtes Wasser) gegeben. Danach wurde es zweimal 15 min lang mit gereinigtem Wasser gewaschen. Nach 12 h Trocknungszeit wurde das Gel mit Coomassie (selbe Lösung wie in der SDS-PAGE) für 30 min gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung (siehe SDS-PAGE) ca. 5 min entfärbt, bis das Gel nahezu farblos, die Banden aber noch gut zu erkennen waren. Zur Auswertung wurde das Gel, wie unter 3.2.3.6 bereits beschrieben eingescannt und ausgewertet. In dieser Arbeit sind die AUCs der einzelnen Banden in Prozent gegen die isoelektrischen Punkte aufgetragen.

3.2.3.8 Lichtblockade (PAMAS)

Die Methode der Lichtblockade basiert auf einer Reduktion der Intensität eines einfallenden Laserstrahls auf Grund von Reflektion, Absorption und Lichtstreuung, wenn Partikel oder Aggregate in der Probelösung den Lichtstrahl durchqueren. Die Abnahme der Lichtstärke ist proportional zur Größe der Partikel. Die Prüfung auf Partikelkontamination - nicht sichtbare Partikel - erfolgte gemäß einer modifizierten Form der Vorschrift Ph.Eur. 2.9.19 [Europäisches Arzneibuch 6.0 2008b]. Für den Luft-Wasser-Grenzflächenstress/Scherstress-Versuch (Kapitel 4.2.2) wurden die Proben in verschiedenen Verdünnungen mit vier Messungen je 1 ml und einem Vorlaufvolumen von 0,5 ml an einem Lichtblockade-Gerät (Partikelmess- und Analysensysteme GmbH, Deutschland) mit der zugehörigen Software PAMAS PMA Programm V2.1.1.1 gemessen. Die erste Messung wurde verworfen und die Ergebnisse der letzten drei Messungen wurden gemittelt. Die Füllrate, Leerrate und Spülrate betrug 10 ml/min. Zwischen den Messungen wurde das Gerät mit 15 ml gereinigtem Wasser gespült. Vor Benutzung des Gerätes wurde ein „Umgebungstest“ durchgeführt, um die Sauberkeit und Zuverlässigkeit des Gerätes zu testen. Hierbei wurde gereinigtes Wasser vermessen und die detektierten Partikel mussten unterhalb bestimmter Spezifikationen liegen (Anzahl Partikel in 25 ml: < 25 Partikel mit der Größe von 10 µm und < 5 Partikel mit der Größe von 25 µm). Nach Auswertung der verschiedenen Verdünnungen wurde das Ergebnis derjenigen Verdünnung verwendet, welches keinen weiteren Verdünnungseffekt mehr zeigte,

und auf die Ausgangskonzentration hochgerechnet (siehe Anhang A2, Tab A.2). Außerdem wurden Placebos vermessen und deren Ergebnisse von den Proben-Ergebnissen abgezogen.

3.2.3.9 Oberflächenspannungsmessung

Die Oberflächenspannung wurde mit einem Ring-Tensiometer (Processor Tensiometer K12, Krüss GmbH, Deutschland) bei 20°C gemessen. Die Proben waren vortemperiert, ebenso wie das Gerät. Der Ring wurde mit gereinigtem Wasser und Aceton gespült und kurz vor der Messung noch einmal ausgeglüht, um eventuelle Verunreinigungen zu beseitigen. Dann wurden 30 ml Probelösung in ein ebenfalls ausgeglühten und abgekühlten Glastiegel gegeben, der Tiegel wurde in das Gerät gestellt und der Ring in der Halterung des Gerätes angebracht. Anschließend wurde das Gerät gestartet. Für Luft wurde die Dichte $0,0012 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ und für Wasser die Dichte $0,9982 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ eingegeben. Eine Mindeststandardabweichung von 0,02 wurde außerdem eingegeben, um die Messungen zu beenden, wenn sie nur noch um diesen Betrag schwankten. Maximal wurden für jede Lösung 50 Messungen durchgeführt. Gemessen wurde die maximale Kraft, die nötig war, um den Ring aus der Grenzfläche zu ziehen. Daraus errechnete sich die Oberflächenspannung. Schließlich wurde der Mittelwert der letzten 10 Messungen verwendet (Tab. 3.1.1). Zur Überprüfung des Gerätes wurde im Vorfeld gereinigtes Wasser gemessen. Der ermittelte Wert lag in der Toleranz von $\pm 1 \text{ mN/m}$ von $72,8 \text{ mN/m}$, welches den Literaturwert darstellt [Bauer et al. 2002].

3.2.3.10 Viskositätsmessung

Die Viskositäten der verwendeten Lösungen wurden im Auftrag mit einem Kegel-Platte Rheometer (Thermo HAAKE RheoStress RS1, Thermo Fischer Scientific, USA) mit Kühlsystem TCP/P (Peltier-temperiertes Platte-Kegel-System) und dazugehöriger Software (HAAKE RheoWin 3.61.00, Thermo Fischer Scientific, USA) vermessen. Dazu wurde 5,2 ml unverdünnte Probe auf die Platte mit einem Spalt von 0,055 mm gegeben und mit dem Kegel C60/1° (Durchmesser 60 mm, Winkel 1°) bei 20°C mit einer Rampe von $250\text{--}550 \text{ s}^{-1}$ geschert. Aus Kanai et al. ist bekannt, dass Scherraten bis 1000 s^{-1} keinen Einfluss auf die Viskosität von Proteinlösungen haben [Kanai et al. 2008]. Je Probelösung wurde dieses Procedere dreimal mit jeweils neuer Lösung wiederholt und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet. Die Werte sind in Tab. 3.1.1 aufgelistet. Es handelt sich bei den Lösungen um Newtonsche Flüssigkeiten, die ein idealviskoses Verhalten zeigten.

3.2.3.11 Dichtemessung

Die Dichte der Proteinlösungen in Tab. 3.1.1 wurden im Auftrag mit einem Biegeschwinger (Densitometer DMA 4500, Anton Paar® GmbH, Österreich) gemessen. Vor der Messung wurden als Referenzen Luft ($0,0012 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3} \pm 0,001$) ebenso wie gereinigtes Wasser ($0,9982 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3} \pm 0,001$) gemessen, um das Gerät auf Sauberkeit und Funktionstüchtigkeit zu überprüfen. Es wurden 5 ml der Proteinlösung mittels Spritze in das Gerät gegeben. Die Viskosität der zu messenden Lösungen wurde dem Gerät vorgegeben, danach wurde bei 20 °C gemessen. Jede Messung wurde zweimal wiederholt. Der Wert der zweiten Messung durfte nicht mehr als $\pm 0,001$ von der ersten Messung abweichen. Falls dies aber der Fall war, weil sich eine Luftblase in der Lösung befand, wurde die Messung wiederholt, bis in der Doppelmessung dieselben Werte resultierten. Nach der Messung wurde mit ca. 100 ml gereinigtem Wasser und 100 ml Ethanol gespült und danach mittels Luftstrom getrocknet. Zum Abschluss wurde erneut durch Messen von gereinigtem Wasser und Luft das System überprüft.

3.2.3.12 pH-Messung

Die Proteinlösungen wurden am pH-Meter (780 pH-Meter, Metrohm, Deutschland) mit angeschlossener Elektrode (Biotrode, Metrohm, Deutschland) gemessen. Vor Benutzung des pH-Meters wurde dieses mit einer Dreipunkt-Kalibrierung mit den pH-Werten pH 4, pH 7 und pH 11 (CeriPUR, Merck, Deutschland) kalibriert. Danach wurde die Kalibrierlösung pH 5 zur Überprüfung noch einmal gemessen. Die pH-Elektrode wurde zum Messen der Proteinlösung in das Vial, die die Lösung beinhaltet, getaucht. Die Lösung wurde mittels eines Magnetrührstäbchens gerührt. Gemessen wurde bei Raumtemperatur. Der pH wurde, nachdem er sich stabilisiert hatte, abgelesen. Bei Abweichungen von dem Sollwert wurde gegebenenfalls mit einer Zugabe von NaOH oder HCl nachjustiert.

3.2.4 CFD-Simulation

Die CFD-Simulation (Computational Fluid Dynamics) wurde während eines Forschungsaufenthaltes an der RWTH Aachen in Zusammenarbeit mit der Aerodynamischen Ingenieurgesellschaft mbH (AIA GmbH, Adenauerallee 206, 52066 Aachen) durchgeführt. Die numerische Simulation sollte den Schüttelvorgang innerhalb eines 2 ml-Vials unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen strömungstechnisch simulieren. Die Ergebnisgrößen, die berechnet wurden, waren abschließend Luft-Wasser-Grenzfläche,

Scherung bzw. Schubspannung, Geschwindigkeit und Druck. Diese Ergebnisgrößen wurden dann mit den im Laborversuch ermittelten Stabilitätsdaten nach dem Schütteln verglichen.

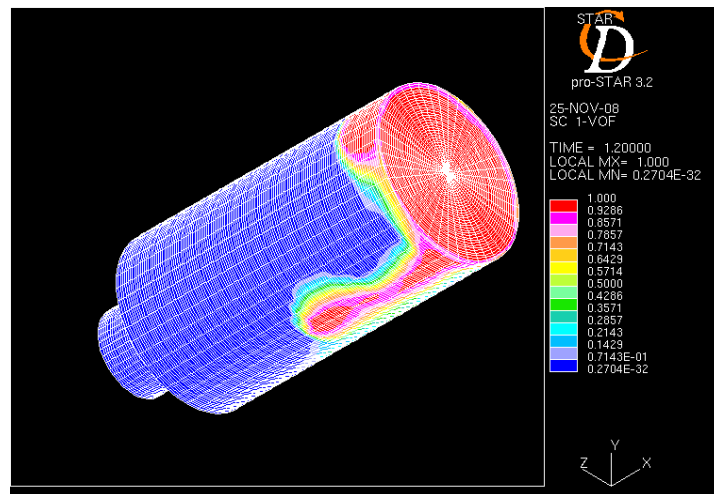


Abbildung 3.1.2 Netzgenerierung mit Gridgen, exportiert in StarCD; rot entspricht Flüssigkeit; blau entspricht Luft; weiße Striche zeigen das Netz

Vorgehensweise:

Zunächst wurde von dem 2 ml-Vial (mit genauen Abmaßen, allerdings Vereinfachung des Flaschenhalses und des Vialbodens, s. Abb. 3.1.2) im Programm Gridgen Vers.15 (Pointwise Inc., USA) ein Gitter mit 216.000 Zellen erzeugt (Abb 3.1.2). Je kleiner die Zellen des Gitters waren, desto genauer war die Simulation, allerdings wurden sie dadurch auch umfangreicher, da sehr viel mehr Gleichungen gelöst werden mussten. Das Gitter wurde in ein kommerzielles CFD-Programm namens StarCD Vers.3.26 (CD-Adapco, USA) eingepflegt. In diesem Programm wurde die Strömung iterativ für jede Zelle während einer vorgegebenen Bewegung berechnet. Strömungen ließen sich nach der Navier-Stokes-Gleichung für inkompressible Fluide folgendermaßen berechnen:

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = \frac{-\nabla p}{\rho} + \mu \nabla^2 \vec{v} + \vec{f}$$

Der Teil links von dem Gleichheitszeichen ($\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}$) beschreibt die Beschleunigung eines Teilchens (Ableitung nach Zeit und Ort), \vec{v} steht für die Geschwindigkeit, t für die Zeit. Rechts des Gleichheitszeichens steht dann die Summe verschiedener Kräfte wie Druckkraft ($\frac{-\nabla p}{\rho}$), Reibungskraft ($\mu \nabla^2 \vec{v}$) und die Gravitationskraft (\vec{f}).

Die Navier-Stokes-Gleichung entspricht dem 2. Satz von Newton, der besagt, dass die Summe aller Kräfte gleich dem Produkt aus Masse und Beschleunigung ist:

$$F = m \cdot a$$

F	Summe aller Kräfte (wie Reibung, Gravitation, Druck, Oberfläche)
m	Masse (Dichte * Volumen)
a	Beschleunigung (Geschwindigkeitsänderung)

Für jede Zelle wurde die Navier-Stokes-Gleichung numerisch gelöst, dabei wurde ein laminares Strömungsverhalten angenommen. Es handelte sich um instationäre Rechnungen, da der Schüttelvorgang eine Bewegung (3 cm Rechts-Links-Bewegung) war. Diese Bewegung musste mit einem anderen Programm (FORTRAN) programmiert werden. Diese Befehle wurden danach in StarCD übernommen, wodurch die Simulation eines bewegten Vials möglich wurde.

Die Dichten und Viskositäten der Proteinlösungen (Tab. 3.1.1), die als Ausgangsgrößen in der Navier-Stokes-Gleichung benötigt wurden, mussten StarCD vorgegeben werden. Die Werte von Luft ebenso wie die Gravitation (mit $9,80665 \text{ m/s}^2$) waren in StarCD hinterlegt. Aus der Navier-Stokes-Gleichung konnte der Druck, wie aber auch die Geschwindigkeit in x, y und z-Richtung berechnet werden, da diese Größen direkt in der Gleichung erschienen. Vor allem aber waren auch lokale Geschwindigkeitsunterschiede ablesbar, die als Ursache für Scherkräfte verstanden werden können.

Die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche wurde über die Methode Volume Of Fluid (VOF) von StarCD berechnet. Sie unterscheidet den Aggregatzustand der einzelnen Zellen über die unterschiedlichen Dichten von Luft und Wasser. Diese Werte sind direkt aus der Navier-Stokes-Gleichung abzulesen.

Die Schubspannung (Scherung) wurde ebenfalls mit Hilfe der Methode VOF unter Hinzunahme der Viskosität nach folgender Formel berechnet:

$$\tau = -\mu \cdot \left[\sqrt{\left(\frac{\partial u}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial z}\right)^2} + \sqrt{\left(\frac{\partial v}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial z}\right)^2} + \sqrt{\left(\frac{\partial w}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial w}{\partial y}\right)^2 + \left(\frac{\partial w}{\partial z}\right)^2} \right] \cdot VOF$$

Zur besseren Beurteilung der berechneten Ergebnisgrößen wie Schubspannung, Druck, Geschwindigkeit und Grenzfläche zwischen Luft und Wasser wurden Mittelwerte, Maximalwerte oder Änderungswerte quantifiziert. Außerdem war zur Visualisierung der

räumlichen Verteilung der Strömungszustände die Darstellung als Film und Bild anhand eines Farbcodes innerhalb des Vials während des Schüttelvorganges möglich. Diese CFD-basierten Filme und Bilder ließen sich dann mit Hochgeschwindigkeitsfilmen aus experimentell ermittelten Daten vergleichen (Anhang A3, Tab. A.3.1, Tab. A.3.2). Da die Strömung der Flüssigkeit bei Beginn der Schüttelbewegung sich erst „einpendeln“ muss, sind in der vorliegenden Arbeit nur Schüttel-Perioden nach „Einpendeln“ als VOF- und Hochgeschwindigkeits-Bilderreihen dargestellt.

3.2.5 Hochgeschwindigkeitsbilder

Die experimentellen Hochgeschwindigkeitsbilder, die ebenfalls im Rahmen der unter 3.2.4 genannten Zusammenarbeit entstanden, wurden mittels einer Kamera (HCC 1000, VDS Vosskühler GmbH, Deutschland), die 462 Bilder pro Sekunde aufnehmen kann, aufgenommen. Dazu wurde wie in Abb. 3.1.3 dargestellt ein Gestell auf den Schüttler gebaut, in welches die Kamera eingesetzt werden konnte. Rechts in Abb. 3.1.3 ist die Einspannvorrichtung für das Vial in einem Foto dargestellt.

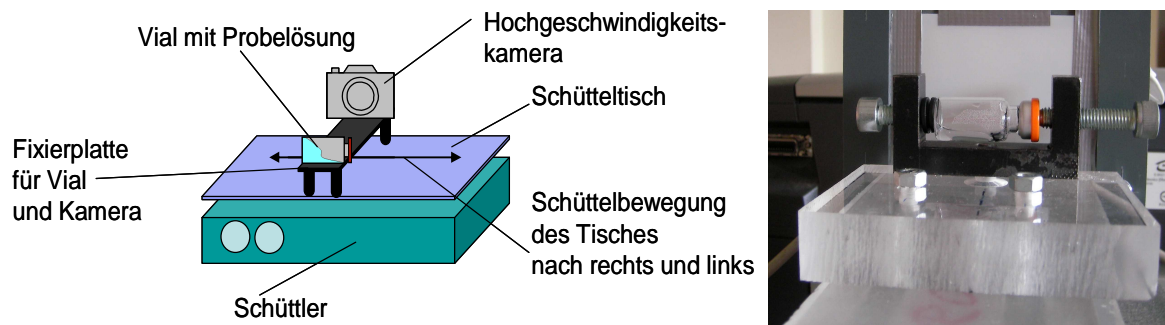


Abbildung 3.1.3 Links: Schemazeichnung der Fixiervorrichtung von Kamera und Vial auf dem Schüttler; rechts: Foto der Fixiervorrichtung des Vials auf dem Schüttler

3.2.6 Statistische Versuchsplanung

Die statistische Versuchsplanung, auch „Design of experiments“ (DoE) genannt, wurde mit dem kommerziellen Programm Applied Cornerstone™ (Version 5.0, Applied Materials, USA) durchgeführt. Der Einfluss von Konzentration, Schüttelintensität, Füllmenge, Zeit und der Zusatz von Polysorbat 80 beim Schütteln sollte statistisch ermittelt werden. Dazu wurde zunächst ein Versuchsplan mit Cornerstone® aufgestellt. Dabei musste der Versuchsraum, in welchem die einzelnen Faktoren berechnet werden sollten, vorgegeben werden. Folgende Grenzen wurden für die Parameter gewählt: Konzentrationen von 1 – 100 mg/ml;

Schüttelintensitäten von 150 – 300 U/min; Füllmengen von 0,5 – 3 ml; Zeiten von 0 - 120 h und Zugabe/keine Zugabe von Polysorbat 80 (Tween 80, 0,05%). Manche Faktoren wurden als quadratische, andere als kubische Funktion in den Berechnungsterm aufgenommen. Bei den quadratischen Funktionen werden drei Punkte im Versuchsraum festgelegt, bei den kubischen vier. Cornerstone[®] selbst generierte (bei Anwahl eines D-optimalen Versuchsplans, wird unten erklärt) zunächst nur quadratische Funktionen. Die Füllmenge wie auch die Schüttelintensität sollten kubisch berechnet werden und mussten aus diesem Grund dem Programm vorgegeben werden. Für die Füllmengen wurde dies gemacht, da aus Vorversuchen nicht klar hervor ging, dass die Funktion rein quadratisch ist. Die Schüttelintensität sollte über 4 Größen (150, 200, 250 und 300 U/min) berechnet werden, damit das Optimum der Schüttelintensität mit größerer Sicherheit berechnet werden kann und die Intensitätsschritte zwischen 150 und 300 in 50er Schritten verliefen (bei einer quadratischen Funktion werden die drei Punkte von Cornerstone[®] an die Grenzen und genau in die Mitte gelegt, Tab. 3.1.4). Die Konzentration und die Zeit wurden quadratisch betrachtet. Die Zugabe von Tween wurde als diskrete Größe (also nur zwei Punkte im Raum) berücksichtigt. Damit kann nur berechnet werden, ob Tween 80 einen Einfluss hat oder nicht. Es wurde ein D-optimales Versuchsdesign gewählt, da mit diesem nur eine recht geringe Anzahl von Versuchen gemacht werden musste, aber ein hoher Informationsgehalt daraus resultierte.

Die Versuchsanzahl für vier kontinuierliche Faktoren ($k = 4$) und einen diskreten (kategorischen) Faktor ($d = 1$) unter Hinzunahme von zwei kontinuierlichen Faktoren mit kubischer Funktion (Füllmenge, Schüttelintensität) berechnet sich nach einem D-optimalen Versuchsplan dann folgendermaßen:

	<u>Formel</u>	<u>Anzahl Versuche</u>
• Konstante im Modell	1	1
• Lineare Haupteffekte	$k+1$	5
• 2-Faktor-Wechselwirkungen	$(k+d)*((k+d)-1)/2$	10
• Quadratische Effekte	k	4
• 2 Faktoren kubisch	2	2
• Versuchsvarianz	$(> = 1)$	5
<hr/>		
27 Versuche		

Daraus resultiert der in Tab. 3.1.4 gezeigte Versuchsplan mit 27 Versuchen. Es werden mindestens so viele Versuche benötigt, wie Terme im Modell zu schätzen sind. Die aus den verschiedenen Termen zusammengesetzte Gleichung sieht folgendermaßen aus:

$y = \alpha_0$	(Konstante im Modell)
$+ \alpha_1 * x_1 + \alpha_2 * x_2 + \dots + \alpha_p * x_p$	(lineare Haupteffekte)
$+ \alpha_{12} * x_1 * x_2 + \alpha_{23} * x_2 * x_3 + \dots + \alpha_{p-1,p} * x_{p-1} * x_p$	(Wechselwirkungen)
$+ \alpha_{11} * x_1^2 + \alpha_{22} * x_2^2 + \dots + \alpha_{pp} * x_p^2$	(quadratische Effekte)
$+ \alpha_{111} * x_1^3 + \alpha_{222} * x_2^3 + \dots + \alpha_{ppp} * x_p^3$	(kubische Effekte)
$+ \text{Fehler}$	(Versuchsvarianz)

Die Zielgröße ist mit y dargestellt, die Einflussgrößen mit x , die Parameter oder Koeffizienten, die geschätzt werden müssen, sind mit kleinen lateinischen Buchstaben (α) gekennzeichnet.

Die Modellkoeffizienten wurden über eine Regressionsanalyse berechnet. Terme, welche nicht signifikant waren, wurden aus der Gleichung Schritt für Schritt herausgenommen. Es wurde dabei versucht, auf Grund der Stichproben Aussagen über die unbekannte Grundgesamtheit zu machen. Dabei wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% gestattet. Die Parameter Bestimmtheitsmaß (R^2), adjustiertes Bestimmtheitsmaß ($\text{adj. } R^2$) und mittlerer quadratischer Fehler der Einzelmessung (Quadratwurzel der Varianz; RMS-Error) geben die Güte des Fits an. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) gibt den Anteil der Streuung an, die durch das Modell erklärt werden können. Das adjustierte Bestimmtheitsmaß ($\text{adj. } R^2$) gibt dasselbe an, ist aber unabhängig von der Anzahl der Terme. Der mittlere quadratische Fehler der Einzelmessung (RMS-Error) stellt die Standardabweichung der Residuen unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade des Modells dar. Er wird immer in der Einheit der Zielgröße angegeben. Die Standardabweichung der Residuen (SD_R) gibt eine Prognosegenauigkeit und die unerklärte Reststreuung an. Cornerstone[®] gab in seinem Versuchsplan einige Versuche mehr an, als notwendig gewesen wäre, um ein gutes Modell aufzustellen (Freiheitsgrade). Wenn die Streuung groß und der gewünschte Effekt klein ist werden mehr Freiheitsgrade benötigt, um den Effekt noch sicher bestimmen zu können. Weiterhin muss gewährleistet sein, dass die Einflussgrößen frei voneinander einstellbar sind und sich nicht gegenseitig bedingen [Scheffler 1997]. Da Cornerstone[®] randomisierte Versuchspläne ausgibt und die Versuche auch strikt in der vorgegebenen Reihenfolge durchgeführt werden sollten, dies aber beispielsweise für die Schüttelintensität in dem

vorliegenden Fall keinen Sinn machte, wurde für diesen Faktor die Randomisierung aufgehoben.

Nach der Regressionsanalyse konnten anhand des Modells mit einem bestimmten Fehler Vorhersagen für neue Parameterkombinationen gemacht werden und Wechselwirkungen zwischen Parametern erkannt werden.

Tabelle 3.1.4 Versuchsplan Cornerstone®

	Füllvolumen [ml]	Konzentration [mg/ml]	Zeit [h]	Intensität [U/min]	Tween [%]
1	3,0	1	120	150	0
2	0,5	100	120	150	0
3	3,0	100	0	150	0
4	3,0	1	0	150	0,05
5	0,5	100	0	150	0,05
6	3,0	100	120	150	0,05
7	0,5	1	120	150	0,05
8	0,5	1	0	150	0
9	3,0	50	48	200	0
10	2,2	100	0	200	0,05
11	1,3	50	120	200	0,05
12	2,2	100	120	200	0
13	2,2	50	120	250	0,05
14	1,3	1	120	250	0
15	0,5	1	0	250	0,05
16	3,0	100	48	250	0,05
17	1,3	100	0	250	0
18	0,5	1	120	300	0
19	3,0	100	0	300	0,05
20	1,3	1	48	300	0,05
21	0,5	100	120	300	0,05
22	3,0	1	120	300	0,05
23	0,5	100	0	300	0
24	1,3	50	0	300	0,05
25	3,0	100	120	300	0
26	3,0	1	0	300	0
27	2,2	100	48	300	0

3.2.7 Aufkonzentrierungs-Studien

Zur Aufkonzentrierung der 10 mg/ml PBS-gepufferten Cetuximab-Proben wurden verschiedenen Techniken eingesetzt. Für die Machbarkeitsstudie (Kapitel 4.3.3) wurden nach verschiedenen Zeiten die Aufkonzentrierungstechniken unterbrochen und Proben entnommen, von welchen am UV/VIS-Gerät die Konzentration bei 280 nm bestimmt wurde. Für die Stabilitätsstudie wurde die Aufkonzentrierungstechnik so lange durchgeführt, bis 100 mg/ml erreicht waren, dann wurde die komplette restliche aufkonzentrierte Lösung entnommen und wie unter 3.2.1 beschrieben in 2 ml-Vials (jeweils Triplets) gefüllt und bei verschiedenen Temperaturen (Kapitel 3.2.2.4) eingelagert. Auch die Filtrate wurden nach dem

Aufkonzentrierungsprozess am UV/VIS-Gerät auf Proteingehalt geprüft, um die Unversehrtheit der Membranen zu bestätigen.

3.2.7.1 Dialyse

Die Dialyse wurde mit Slide-A-Lyzer Dialysenkassetten (12-30ml, Pierce, USA) mit einem Cut-off von 10 kD durchgeführt (Abb. 2.6.1 C). Die Membranen bestanden aus regenerierter Zellulose. Als hyperosmotisches Medium wurde Spectra/Gel™ Absorbent (Spectrum Laboratories Inc., USA) verwendet. Die Dialysenkassetten wurden zunächst im Placebo-Puffer für 2 min inkubiert, um die Membranen zu hydratisieren. Anschließend wurden sie über eine Spritze mit Kanüle mit je 30 ml Antikörperlösung (Cetuximab, 10 mg/ml, PBS) gefüllt. 10 g des Absorbentpulvers (Spectra Gel Absorbent, Tab 3.1.2) wurden pro Dialysenkammer abgewogen und die Membranen der Dialysekammern damit bestreut. Zur Fixierung des Absorbentpulvers an den Membranen wurden die Dialysekammern in Alufolie gewickelt und bei Raumtemperatur gelagert. Zu den Entnahmezeiten wurden die Alufoliepackchen geöffnet und Proben entnommen. Nach Öffnen der Alufoliepackchen wurde das Pulver, das inzwischen teilweise gelartig war, entfernt und über eine Spritze die aufkonzentrierte Antikörperlösung aus der Dialysenkammer gesaugt und in ein anderes Gefäß überführt.

3.2.7.2 Zentrifugalkonzentratoren

Für diese Methode wurden Amicon Ultra-15-Zentrifugen-Filtereinheiten verwendet (Abb. 2.6.1 B). Die Filtermembran bestand in diesem Fall aus einer regenerierten Zellulose mit verschiedenen Ausschlussgrenzen von 30, 50 und 100 kD. Die Zentrifugalkonzentratoren wurden in einer Multifuge 3SR+ (Heraeus, Deutschland) mit 2000 g bei eingestellten 23°C zentrifugiert. Die Beschleunigung und Bremsgeschwindigkeit wurde von 9 möglichen Stufen, wobei 9 die höchste Geschwindigkeit darstellt, auf jeweils 3 gesetzt. Die Zentrifuge wurde nach entsprechenden Aufkonzentrierungs-Zeiten angehalten, um Proben aus den Zentrifugalkonzentratoren zu entnehmen. Die aufkonzentrierten Proben wurden vor der Entnahme in den Zentrifugalkonzentratoren leicht aufgeschüttelt, um evtl. an dem Filter hängendes Protein in Lösung zu bringen. Danach wurde die Probe mit einer Pipette entnommen und in ein anderes Gefäß überführt.

3.2.7.3 Tangentialstromfiltration (TFF)

Es wurde eine TFF-Anlage im Labormaßstab verwendet (Labscale TFF-System, Millipore, USA) (Abb. 2.6.1 D). Die eingesetzte Membran (Ultracel PLCTK, Millipore, USA) war aus regenerierter Zellulose und hatte eine Ausschlussgrenze von 30 kD. Sie wurde nach Einbau in

das Gerät zunächst mit 500 ml Wasser gespült und anschließend getestet. Bei einem vorgegebenen Transmembrandruck (TMP) von 1,5 bar wurde der Fluss des Wassers pro min bestimmt. Er lag für alle Versuche bei 28 ± 1 ml/min. Danach wurden die Anlage und die Membran mit 200 ml Puffer inkubiert. Für die Aufkonzentrierung wurde dann die vorgesehene Menge Proteinlösung in den Vorlauftank gegeben und die Aufkonzentrierung mit einem TMP von 1,5 bar gestartet. Der TMP setzte sich aus einem Eingangsdruck von 2 bar und einem Ausgangsdruck von 1 bar, dividiert durch zwei, zusammen (Kapitel 2.6). Die Rührgeschwindigkeit wurde an dem Gerät auf die Stufe 2 gestellt. Das Rühren im Vorlauftank diente zur Durchmischung der Proteinlösung.

3.2.7.4 Rührzelle

Für die Versuche wurde eine Amicon Rührzelle (Modell 8050, Millipore, USA) verwendet. Die Rührzelle wurde mit 50 ml Proteinlösung gefüllt und mit einer regenerierten Zellulose-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kD (Ultracell YM-30, Millipore, USA) bestückt. Für jede Aufkonzentrierung wurde eine neue Membran verwendet, welche zuvor mit 50 ml Wasser und anschließend mit 50 ml Puffer gespült wurde. Es wurde ein Druck von 0,69 bar mit Stickstoff angelegt und auf einem Rührer (Stir SB161, Stuart) bei der Stufe 2 gerührt. Die Aufkonzentrierung fand bei Raumtemperatur statt. Nach verschiedenen Zeiten wurde der Druck reduziert, die Zelle geöffnet und Proben mit einer Pipette aus der Zelle entnommen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Identifizierung geeigneter Stressbedingungen in der Präformulierung

In dem folgenden Ergebnisteil soll anhand verschiedener Stressmodelle die Auswirkung von physikalischem Stress auf monoklonale Antikörper behandelt werden. Physikalischer Stress kann während der Herstellung, Lagerung und des Transportes von Proteinarzneimitteln entstehen.

Das Hauptziel der Versuche in diesem Kapitel war die Entwicklung einer diskriminierenden Stressbedingung für das Schütteln ebenso wie für das Rühren. Diese Stressbedingung sollte in relativ kurzer Zeit und unter Verwendung von wenig Probenvolumen einen Unterschied zwischen einer PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung und der auf dem Markt erhältlichen Cetuximab-Formulierung ersichtlich machen können. Nach zukünftigen Untersuchungen mit weiteren Antikörpern könnte davon ausgehend eine Stressbedingung entwickelt werden, die in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung feststellen kann, ob eine neu entwickelte Formulierung ähnlich stabil ist wie eine, die sich schon auf dem Markt befindet. Außerdem könnten durch die Analyse der entstandenen Instabilitäten auch die Auswirkungen des Stresses auf die neue Formulierung und ihr Stabilisierungsgrad beurteilt werden.

Es ist wichtig, in der Proteinanalytik mehrere analytische Methoden einzusetzen, um alle Instabilitäten zu detektieren [Philo 2006]. Meist handelt es sich bei den physikalischen Instabilitäten um Aggregation [Fradkin et al. 2009; Wang 1999]. Unlösliche große Aggregate wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Trübungsmessung [Eckhardt et al. 1994], lösliche Aggregate mittels SEC [Gabrielson et al. 2007; Hartmann et al. 2004] ermittelt. Sehr gut geeignet wäre hierfür auch die Lichtblockade, die aber auf Grund der geringen Probenmenge nicht verwendet werden konnte. Der absolute Monomergehalt, über dessen Abnahme am besten auf die Gesamtheit aller Aggregate und Degradationsprodukte geschlossen werden kann, wurde ebenfalls mittels SEC bestimmt.

Bisher existieren noch keine Richtlinien für mechanische Stressuntersuchungen an Proteinlösungen, obwohl diese Stressmethoden (vor allem Schütteln) sehr häufig zum Überprüfen der physikalischen Stabilität einer Proteinlösung eingesetzt werden [Patro et al. 2002]. Derzeit werden noch unterschiedlichste Schüttelprotokolle verwendet [Kiese et al. 2008; Mahler et al. 2005b]. Aus diesem Grund sollte auch der Einfluss einer Stress-Parameteränderung hier untersucht werden.

4.1.1 Rührstress: Einfluss verschiedener Parameter auf die Stabilität eines monoklonalen Antikörpers

4.1.1.1 Rührgeschwindigkeit

Um den Einfluss der Rührgeschwindigkeit zu untersuchen, wurde ein Rührversuch mit zwei Cetuximab-Lösungen (pH 7,2 PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml; Marktformulierung von Cetuximab (Erbix[®]) mit ebenfalls 5 mg/ml) bei zwei Rührgeschwindigkeiten (100, 160 U/min) in einem 2 ml-Vial mit 1 ml Füllvolumen durchgeführt. Jeweils 3 Vials pro Formulierung wurden nach 0, 5, 24 und 48 h von der Rührplatte entfernt und untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.1.1, 4.1.2 und 4.1.3 dargestellt.

Visuell wie auch in der Trübungsmessung war zu erkennen, dass sich Marktformulierung und PBS-gepufferte Lösung nach Verwendung der Rührgeschwindigkeit von 100 U/min nach 48 h Rühren unterschieden, nach Verwendung der Rührgeschwindigkeit von 160 U/min hingegen nicht (Abb. 4.1.1). Die gepufferte Lösung war bei 100 U/min wesentlich stärker trüb als die Marktformulierung, allerdings war auch die Marktformulierung nach 48 h Rühren leicht getrübt. Dies bedeutet, dass beide Lösungen unlösliche Aggregate enthielten, allerdings in einem unterschiedlichen Ausmaß. Bei Benutzung der Rührgeschwindigkeit von 160 U/min waren beide Lösungen stark getrübt, was darauf hindeutete, dass der Stress zu stark und nicht diskriminierend war.

Die SEC-Ergebnisse zeigten im Gegensatz zu den Trübungsmessungsergebnissen kein aussagekräftiges Ergebnis (Abb. 4.1.3). Die Startwerte schwankten extrem. Für alle Lösungen konnte über die Stresszeit ein Monomergehaltsabfall detektiert werden, abgesehen von der Marktformulierung bei 100 U/min (Marktformulierung 160 U/min: 76 % Monomer nach 48 h im Vergleich zum Start; PBS-gepufferte Lösung 160 U/min: 71 % Monomer; Marktformulierung 100 U/min: 106 % Monomer; PBS-gepufferte Lösung 100 U/min: 88 % Monomer). Der sehr geringe Startwert der Marktformulierung bei 100 U/min lässt hier sogar ein leichtes Zunehmen des Monomergehaltes (106%) erkennen. Da dies nicht möglich sein kann, sollte diese Grafik unter Vorbehalt betrachtet werden.

Die abweichenden Ergebnisse von Trübungsmessung und SEC-Messung können so begründet sein, dass sich in der gepufferten Lösung wenige Monomere zu unlöslichen Aggregaten zusammenlagerten, die eine recht starke Trübung verursachten. Der Gesamt-Monomergehalt ändert sich dadurch jedoch praktisch kaum. Der Anteil an löslichen Aggregaten lag für beide

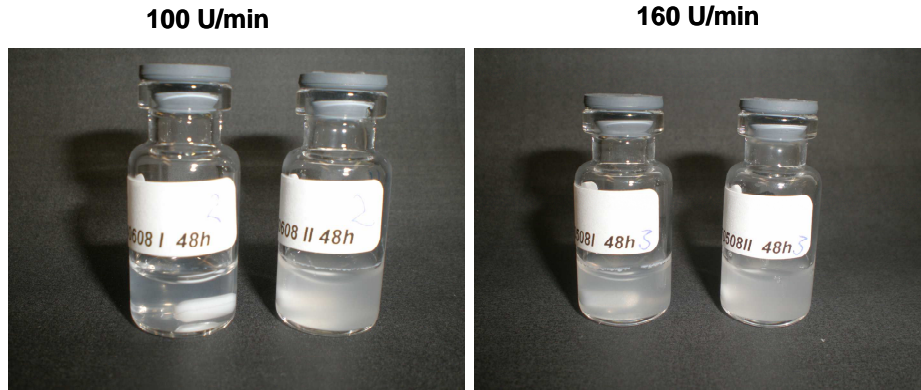


Abbildung 4.1.1 Visuelle Kontrolle nach 48 h Rühren bei unterschiedlicher Geschwindigkeit: jeweils linkes Vial im Bild: Cetuximab-Marktformulierung; rechtes Vial im Bild: PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung

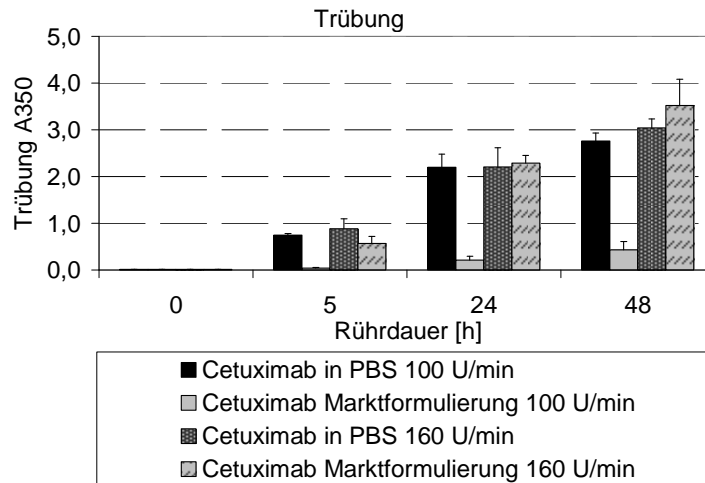


Abbildung 4.1.2 Trübungsmessung mittels UV/VIS-Spektroskopie von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung und Cetuximab-Marktformulierung nach verschiedenen Rührzeiten bei 100 und 160 U/min

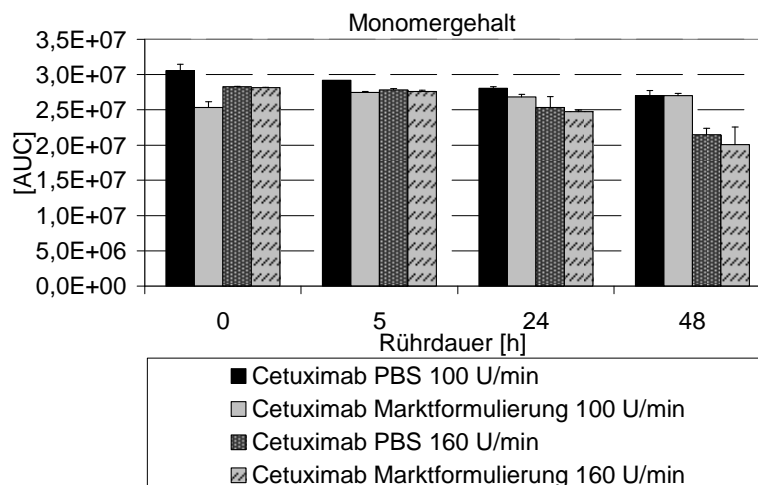


Abbildung 4.1.3 SEC-Monomergehaltsbestimmung von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung und Cetuximab-Marktformulierung nach verschiedenen Rührzeiten bei 100 und 160 U/min

Formulierungen stets unter 0,3 % (siehe Anhang A4, Tab. A.4). Auch ein Unterschied der Degradationsprodukte (mittels SEC bestimmt) bei den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten konnte nicht detektiert werden. Da über die zwei untersuchten Rührgeschwindigkeiten keine Diskriminierung, also Unterscheidung der Formulierungen hinsichtlich des Monomergehaltes herbeigeführt werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Füllmenge variiert.

4.1.1.2 Füllmenge innerhalb des Vials

In dem Versuch mit variierenden Füllmengen wurde die Rührgeschwindigkeit von 100 U/min verwendet, da im vorhergehenden Versuch bei dieser Geschwindigkeit visuell und in der Trübungsmessung eine leichte Diskriminierung beobachtet werden konnte. Neben den bereits zuvor verwendeten 1000 µl Füllvolumen pro 2 ml-Vial wurden außerdem 750 µl und 500 µl als Füllmenge getestet. Bei geringeren Füllmengen sollte sich bei gleich bleibender Rührgeschwindigkeit die Luft-Wasser-Grenzfläche (LWG) prozentual zum Gesamtvolumen vergrößern [Lahlou et al. 2009]. Da Luft-Wasser-Grenzflächen als Ursachen für Instabilitäten diskutiert werden [Maa und Hsu 1997], könnte damit möglicherweise eine Stressvergrößerung und eine Diskriminierung erreicht werden.

Eine geringere Füllmenge scheint tatsächlich einen stärkeren Stress zu erzeugen, denn die mittels UV/VIS-Spektroskopie detektierte Trübung nahm mit abnehmender Füllmenge zu (Abb. 4.1.4). Der Monomergehalt (Abb. 4.1.5) bestätigte diese Tendenz für die PBS-gepufferte Lösung, indem er mit Füllmengenabnahme auch eine Abnahme zeigte. Die Marktformulierung hingegen ließ keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Füllmengen erkennen, nur ein leicht abfallender Monomergehalt mit zunehmender Stresszeit war zu detektieren. Dieser Abfall war für alle Füllmengen geringer als der der PBS-gepufferten Lösung. Diese stabilen Monomergehalte der Marktformulierung über die Zeit könnten auf die Anwesenheit des Tweens zurückgeführt werden, welches an Luft-Wasser-Grenzflächen stabilisierend wirkt [Bam et al. 1998; Chou et al. 2005; Wang et al. 2008b]. Deshalb konnte bei Veränderung des Anteils der LWG durch Füllmengenerniedrigung auch kein sehr starker Effekt in der Marktformulierung gesehen werden. Auch in der Trübungsmessung waren die Trübungswerte der Marktformulierung bis 48 h erheblich kleiner als die der PBS-gepufferten Lösung. Eine Diskriminierung war also möglich. Doch der Faktor Zeit spielt auch eine erhebliche Rolle, denn nach 120 h stiegen auch die Trübungswerte der Marktformulierung (vor allem für die geringer befüllten Vials). Allerdings zeigten diese Mittelwerte sehr große Standardabweichungen, was auf große Unterschiede zwischen den drei untersuchten Vials hindeutet.

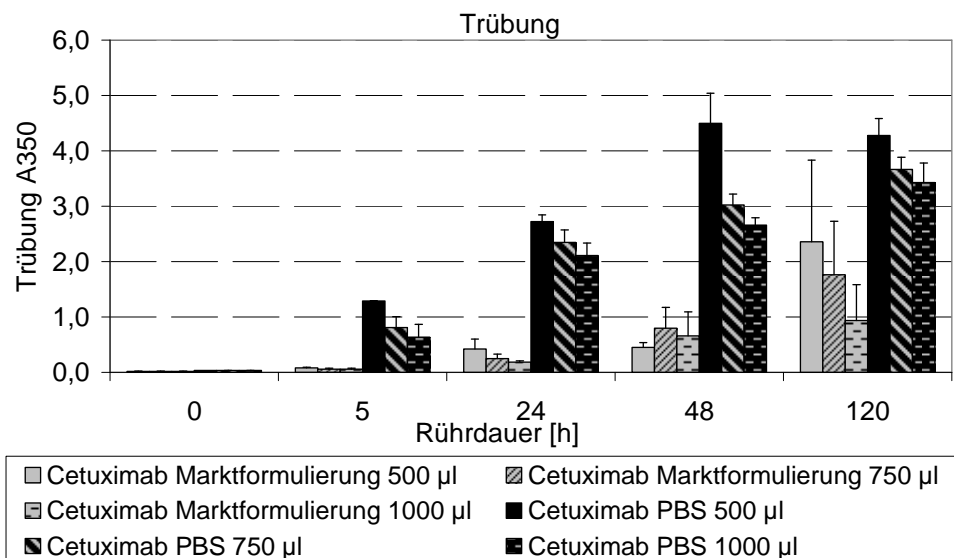


Abbildung 4.1.4 Trübungsmessung mittels UV/VIS-Spektroskopie von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung und Cetuximab-Marktformulierung nach verschiedenen Rührzeiten bei 100 U/min und unterschiedlichen Füllmengen

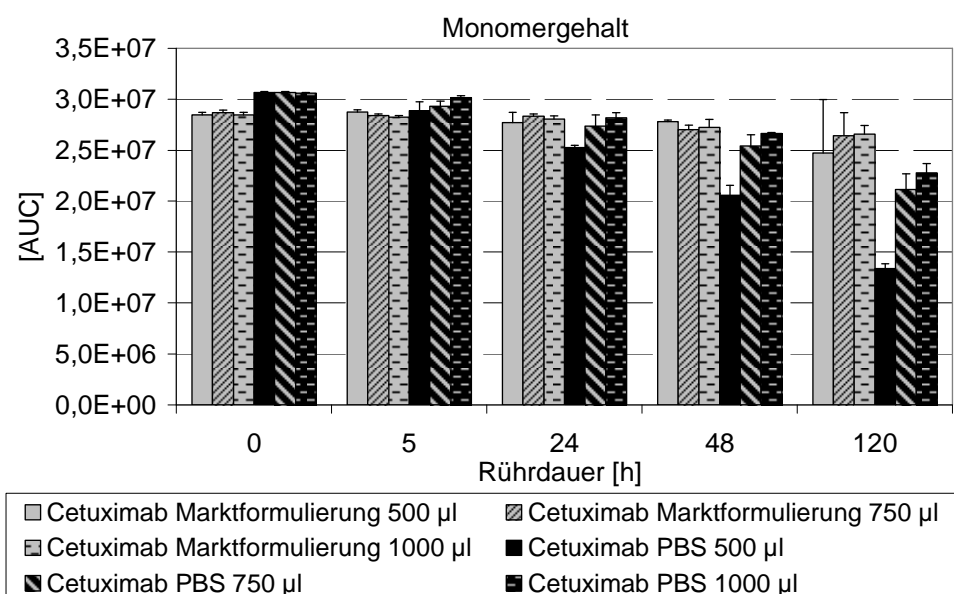


Abbildung 4.1.5 SEC-Monomergehaltsbestimmung von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung und Cetuximab-Marktformulierung nach verschiedenen Rührzeiten bei 100 U/min und unterschiedlichen Füllmengen

Was den Anteil löslicher Aggregate, die mittels SEC detektiert wurden, betrifft, war dieser immer sehr gering ($< 0,3\%$ siehe Anhang A4, Tab. A.4). Erst nach 120 h stieg der Anteil der Aggregate in der Marktformulierung (500 µl Füllvolumen) einmalig auf $2,5\%$ (Anhang A4, Tab. A.4). Dies könnte mit dem stabilisierenden Effekt des Tweens zusammen hängen, welches vielleicht auch kleine Aggregate stabilisiert oder einfach dazu beiträgt, dass kaum

größere Aggregate entstehen. Die nicht-tweenhaltige PBS-gepufferte Lösung bildete sofort größere Aggregate, die deutlich in der Trübungsmessung detektiert werden konnten. Nach Analyse der Monomergehalte, welche hier maßgebend für die Beurteilung der Diskriminierung herangezogen wurden, konnte das Rühren mit 500 µl Füllvolumen als diskriminierend ausgemacht werden, denn bereits ab 24 h konnte ein deutlicher Unterschied zwischen der Marktformulierung und der gepufferten Formulierung erkannt werden. Es fand also eine Diskriminierung über die Zeit statt. Ein Rührversuch bei 100 U/min mit 500 µl bis 48h/120 h kann dazu verwendet werden, um eine schlechtere Formulierung von einer Marktformulierung zu unterscheiden, zumindest im Falle von Cetuximab. Um dies allgemeingültig zu machen, müssten allerdings noch weitere Antikörper und deren Marktformulierungen getestet werden.

4.1.1.3 Verstärkte Diskriminierung

Um die diskriminierende Bedingung, die in dem Versuch zuvor entwickelt wurde, noch zu verstärken, wurde in diesem Versuch eine Rührgeschwindigkeit von 120 U/min mit 500 µl Füllvolumen gewählt. Durch eine höhere Rührgeschwindigkeit wurde die Ausbildung einer noch etwas vergrößerten Luft-Wasser-Grenzfläche ebenso wie einer stärkeren Scherung und damit eine verstärkte Diskriminierung erwartet.

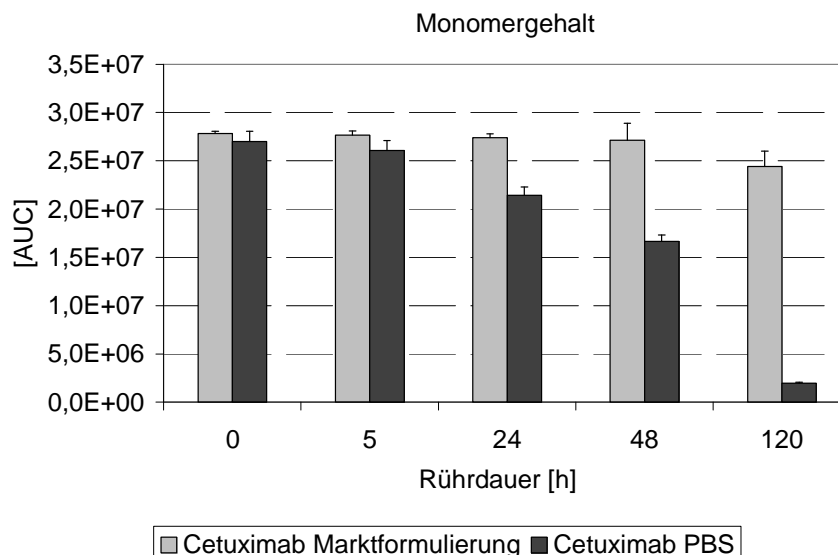


Abbildung 4.1.6 SEC-Monomergehaltsbestimmung von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung und Cetuximab-Marktformulierung nach verschiedenen Stresszeiten bei 120 U/min und 500 µl Füllmenge

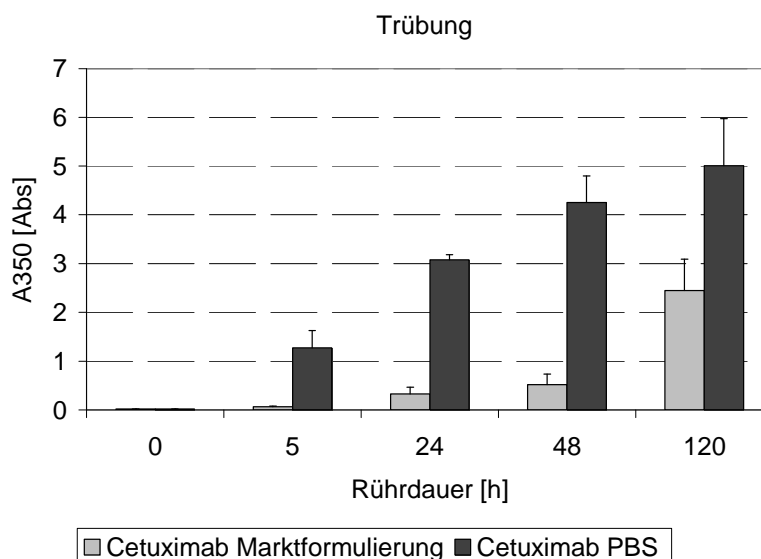


Abbildung 4.1.7 Trübungsmessung von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung und Cetuximab-Marktformulierung nach verschiedenen Stresszeiten bei 120 U/min und 500 µl Füllmenge

Wie die Ergebnisse zeigen, konnte auch tatsächlich durch die Geschwindigkeitserhöhung diese verstärkte Diskriminierung erreicht werden (Abb. 4.1.6, 4.1.7). Der Monomergehalt der PBS-gepufferten Lösung war nach 120 h fast komplett abgefallen im Gegensatz zu der Marktformulierung, die bis 48 h stabil blieb und nur einen leichten Abfall nach 120 h zeigte. In der Trübungsmessung ließ sich ein starker Trübungsanstieg der PBS-gepufferten Lösung detektieren, wohingegen die Marktformulierung nur einen geringen Trübungsanstieg bis 48 h zeigte. Erst nach 120 h war auch in der Marktformulierung eine stärkere Trübung zu beobachten (Abb. 4.1.7). Wenn der diskriminierende Charakter dieser Stressbedingung noch mit weiteren Marktformulierungen bestätigt werden könnte, könnte mit dieser Methode beurteilt werden, ob eine neue Formulierung sich ähnlich wie eine Marktformulierung verhält und eine vergleichbare Qualität besitzt oder nicht.

4.1.1.4 Einfluss von Tween 80

Im Folgenden wurde versucht zu beleuchten, welche Faktoren für die Diskriminierung verantwortlich waren, also dass die PBS-gepufferte Lösung instabil wurde, während die Marktformulierung weitestgehend stabil blieb. Durch die Füllmengen-Erniedrigung und eine schnellere Rührgeschwindigkeit wurde die Luft-Wasser-Grenzfläche vergrößert. Auch erhöhte sich der mechanische Stress, der innerhalb der Antikörperlösung zu verstärkter Aggregation führt [Maa und Hsu 1997]. Um eine Aggregatbildung durch diese Faktoren zu verhindern, werden Hilfsstoffe wie Tween zugesetzt (ist in der Marktformulierung von Cetuximab enthalten) [Jones et al. 1997; Katakam et al. 1995; Loughheed et al. 1983]. Im

folgenden Versuch wurde aus diesem Grund der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung 0,01% Tween 80 zugesetzt. Diese Lösung wurde im Vergleich zu der reinen PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung sowie der Marktformulierung von Cetuximab mit Hilfe der oben erwähnten diskriminierenden Methode untersucht. Die Marktformulierung unterscheidet sich von der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung außer durch den Zusatz von Tween 80 auch noch durch ein anderes Puffersystem mit einem anderem pH-Wert (pH 5,5 anstelle von 7,2) und durch den Zusatz von Glycin (Tab. 3.1.1). Aus diesem Grund wurde Tween 80 zu der gepufferten Lösung gegeben, um nur den stabilisierenden Effekt des Tweens und nicht den Einfluss der anderen Hilfsstoffe in der Marktformulierung zu erkennen.

Das Ergebnis für den Monomergehalt ist in Abb. 4.1.8 dargestellt. Die mit Tween versetzte Lösung verhielt sich ebenso wie die Marktformulierung, was für die gute Stabilisierung des Tween 80 unter Verwendung dieses Stressmodells spricht und dafür, dass Tween in der Marktformulierung in diesem Stressmodell den größten stabilisierenden Effekt ausübt. Mit der reinen PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung konnte leider in einem Wiederholungsversuch nur ein wesentlich geringerer Monomergehaltsabfall detektiert werden. Dies spricht für eine schlechte Reproduzierbarkeit. Dennoch war auch bei geringerem Monomergehaltsverlust die Diskriminierung zu der tweenhaltigen Probe ab 24 h gegeben. Gründe für die schlechte Reproduzierbarkeit könnten eine nicht einheitliche Scherung der Magnetührstäbchen auf den Vialböden sein, da die Vials etwas unterschiedlich gewölbte Böden besaßen. Auch eine lokale Temperaturerhöhung an dem Vialboden durch die Scherung könnte vermutet werden.

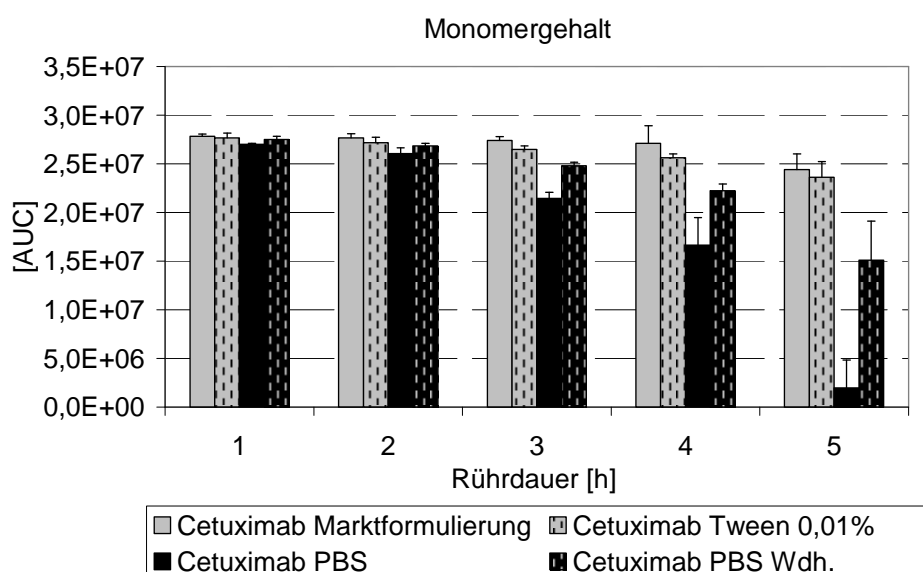


Abbildung 4.1.8 SEC-Monomergehaltsbestimmung von den Proben Cetuximab-Marktformulierung, PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung, PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung mit 0,01% Tween, erneut PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung nach Rührstress (2 ml-Vial; 500 µl; 120 U/min; RT)

4.1.1.5 Einfluss der Temperatur

Im folgenden Versuch wurde der Einfluss der Temperatur auf das Rührergebnis untersucht, da bekannt ist, dass erhöhte Temperaturen ebenfalls Protein-Aggregation verursachen können [Persson und Gekas 1994; Zheng und Janis 2006]. Dazu wurde wieder Cetuximab-Marktformulierung mit PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung verglichen und bei Raumtemperatur (RT, $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) und Kühlschranktemperatur (KT; $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) mit 120 U/min und 500 μl Füllmenge (am stärksten diskriminierende Bedingung) gerührt. Die Ergebnisse zeigten, dass kaum ein Unterschied zwischen den bei RT und den im Kühlschrank gerührten Proben ermittelt werden konnte (Abb. 4.1.9; Abb. 4.1.10). Die Trübungswerte wie auch die Monomergehaltsverluste beliefen sich innerhalb der Standardabweichungen bei RT wie bei KT bis 48 h auf dieselben Ergebnisse.

Allerdings resultierten nach 120 h Rühren bei KT für die Marktformulierung sehr hohe Standardabweichungen, was auf Unterschiede innerhalb eines Triplets zurückzuführen ist. Dadurch war ein Vergleich zur RT für die Marktformulierung schwer zu ziehen. Und auch die PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung ließ sich nach 120 h in der Trübungsmessung nicht mehr mit der PBS-gepufferten Lösung gerührt bei RT vergleichen. Denn in der visuellen Kontrolle zeigte sie nach 120 h Rühren bei KT einen Rand mit Präzipitaten an der Glaswand (Abb. 4.1.11). Die Marktformulierung zeigte bis 48 h unabhängig davon, bei welcher Temperatur sie gestresst wurde, ein gleiches Aussehen.

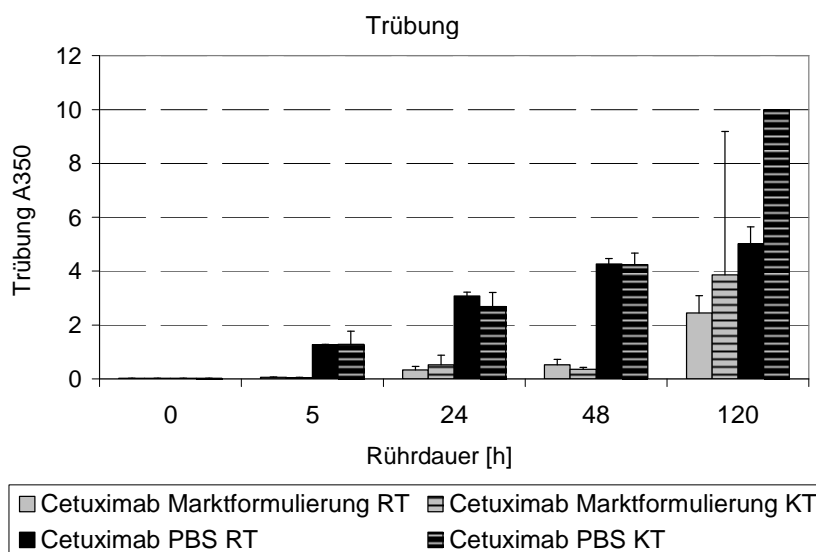


Abbildung 4.1.9 Trübungsmessung mittels UV/VIS-Spektroskopie bei 350 nm von Cetuximab-Marktformulierung und PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung nach Rühren (2 ml-Vial; 500 μl ; 120 U/min) bei Raumtemperatur (RT) und Kühlschranktemperatur (KT)

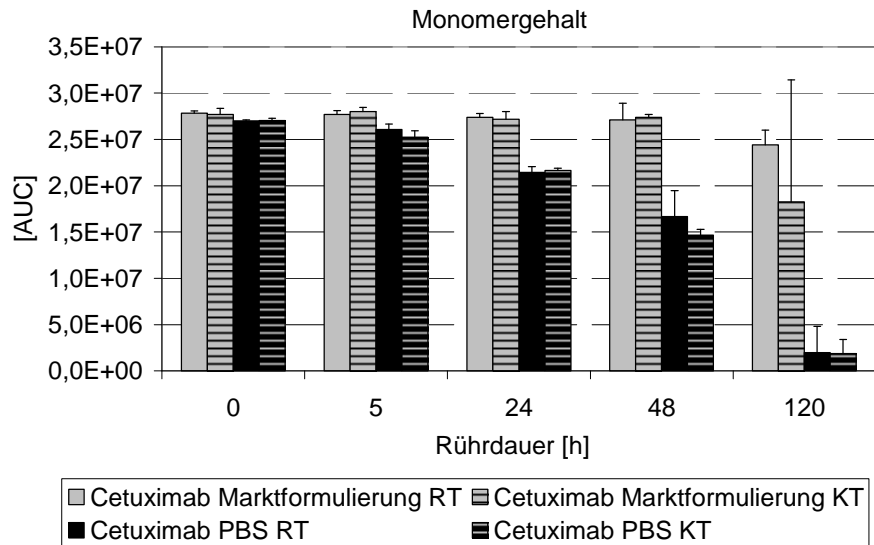


Abbildung 4.1.10 SEC-Monomergehaltsbestimmung von Cetuximab-Marktformulierung und PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung nach Rühren (2 ml-Vial; 500 µl; 120 U/min) bei Raumtemperatur (RT) und Kühlschranktemperatur (KT)

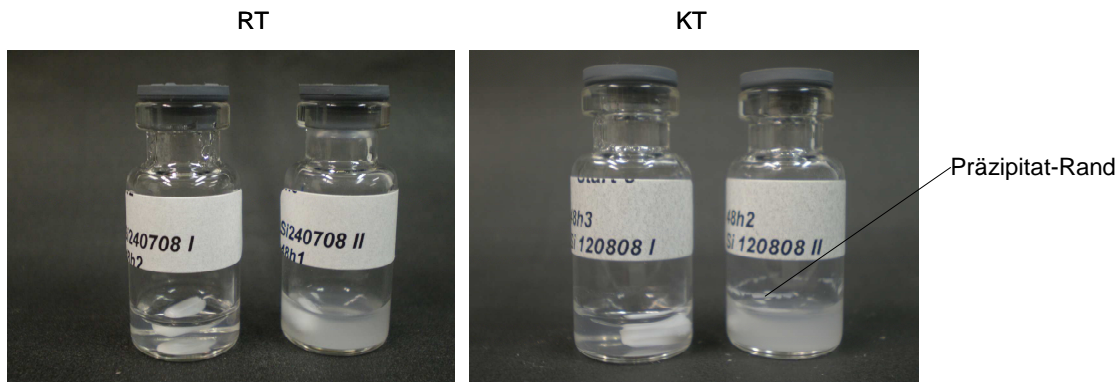


Abbildung 4.1.11 Visuelle Kontrolle der Cetuximab-Marktformulierung (jeweils links im Bild) und PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (jeweils rechts im Bild) nach 120 h Rühren (2 ml-Vial; 500 µl; 120 U/min) bei Raumtemperatur (RT) und Kühlschranktemperatur (KT)

Die PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung ließ bei KT bis 48 h annähernd dieselben Instabilitäten wie bei RT erkennen. Also konnte bis 48 h die diskriminierende Bedingung auch im Kühlschrank reproduziert werden. Da in der frühen Formulierungsentwicklung schnell und mit wenig Volumen ein Ergebnis generiert werden soll, sind 48 h Rühren in diesem Fall vollkommen ausreichend. Schlussfolgernd ist es nicht zwangsläufig notwendig, Rührversuche bei KT durchzuführen, um einen Wärmeeffekt auszuschließen. Zumindest mit der aus 4.1.3 entwickelten diskriminierenden Methode konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Temperaturen nachgewiesen werden. Rühren bei höheren Temperaturen als RT könnte allerdings einen Einfluss auf das Ergebnis haben.

4.1.1.6 Zusammenfassende Diskussion - Rührstress

In den vorliegenden Versuchen wurde gezeigt, dass es unter bestimmten Bedingungen möglich ist, Rühren als stabilitätsuntersuchende Methode für physikalischen Stress zu verwenden. Als am stärksten diskriminierend wurde das Rühren im 2 ml-Vial mit 500 µl Füllmenge, nach 48 h Rührzeit (bei RT) und 120 U/min identifiziert. Dieses Verfahren ist damit eine geeignete „small scale“-Methode für die frühe Phase der Arzneimittelentwicklung. Mit dieser Methode ist es möglich, zwischen der Cetuximab-Marktformulierung und einer PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung zu unterscheiden, allerdings mit einem relativ großen Fehler, da die Ergebnisse der gepufferten Cetuximab-Lösung nicht sehr gut reproduzierbar waren. Weiterhin lässt sich festhalten, dass die gewählte Temperatur auf die gewählte diskriminierende Bedingung bis 48 h Rührzeit keinen Einfluss hatte.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Rühren Aggregation verursacht [Maruyama et al. 2001b] und als Stressart zur Beurteilung physikalischer Instabilitäten schon häufig untersucht wurde [Kiese et al. 2008; Lahlou et al. 2009; Mahler et al. 2005b]. Lahlou et al. verwendeten für ihre Untersuchungen ebenfalls die auch hier eingesetzte aktuelle Cetuximab-Marktformulierung im Vergleich zu einer alten Marktformulierung. Diese bestand wie in den hier beschriebenen Versuchen aus einer PBS-gepufferten Lösung, allerdings mit einer anderen Konzentration (2 mg/ml). Trotz eines anderen Rührstresses (andere Vials, andere Füllmenge, andere Rührgeschwindigkeit) konnten ähnliche Ergebnisse wie in den vorliegenden Versuchen generiert werden. Die aktuelle Marktformulierung zeigte erheblich weniger Aggregate und einen geringeren Monomergehaltsverlust im Vergleich zu der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung. Als Ursache dafür führte diese Arbeitsgruppe die höhere Konzentration (5 mg/ml gegenüber 2 mg/ml) und die Anwesenheit von Tween 80 und Glycin in der aktuellen Marktformulierung an [Lahlou et al. 2009]. Außerdem konnten sie mittels DLS (Dynamic Light Scattering) eine Dimerbildung in der Marktformulierung im Gegensatz zu der PBS-Formulierung ausmachen. Diese Dimerbildung ausgelöst durch die anderen Hilfsstoffe wurde als Ursache für die bessere Stabilität diskutiert. Die hier gezeigten Versuche weisen allerdings darauf hin, dass allein schon das zugesetzte Tween 80 eine sehr gute Stabilisierung bewirkt, so dass eine PBS-gepufferte Lösung mit 0,01% Tween 80 nahezu dieselben Ergebnisse zeigte wie die aktuelle Marktformulierung (Abb. 4.1.8). Die Konzentration scheint einen nicht so starken Einfluss in dem Bereich von 2-5 mg/ml zu haben, wie von Lahlou et al. vermutet, denn die oben aufgeführten Versuche ergaben auch in der mit 5 mg/ml konzentrierten PBS-gepufferten Lösung einen hohen Aggregatgehalt (Trübung) (Abb. 4.1.6; 4.1.7). Lösliche

Aggregate, also die von Lahlou et al. diskutierten Dimere, konnten in den hier vorgestellten Versuchen mittels SEC zumindest nicht detektiert werden.

Von Lahlou et al. wurde ebenfalls beobachtet, dass unterschiedliche Füllmengen während des Rührens einen Effekt auf das Analysenergebnis haben können [Lahlou et al. 2009]. Als Grund dafür könnten die unterschiedlichen Luft-Wasser-Grenzflächen-Volumenverhältnisse angeführt werden. Wie in der Literatur beschrieben können Luft-Wasser-Grenzflächen Aggregation bedingen [Sluzky et al. 1991]. In den hier vorgelegten Untersuchungen konnte der Einfluss verschiedener Füllmengen ebenfalls beobachtet und diesbezüglich außerdem gezeigt werden, dass Tween 80 diesen Einfluss aufheben kann. Es ist derzeit nicht geklärt, welche Kräfte während des Rührens für die Instabilitäten wirklich verantwortlich gemacht werden können. Der Einfluss von Luft-Wasser-Grenzfläche und Scherstress auf die Proteinaggregation wird in Kapitel 4.2.2 noch genauer untersucht.

Auch die Arbeitsgruppe von Mahler et al. untersuchte Rührstress und konnte durch Tweenzugabe keine vollständige Stabilisierung des untersuchten Antikörpers innerhalb von 48 h Rührzeit bewirken [Mahler et al. 2005b]. Ihre Vermutung war, dass entweder die zugesetzte Konzentration an Tween nicht ausreichend war oder dass die Aggregatbildung sich nicht vollständig durch Tween verhindern lassen konnte. In den hier vorgelegten Versuchen konnte zwar eine recht gute Stabilisierung des Cetuximabs mittels Tween ermittelt werden, allerdings wurden hier andere Versuchsparameter als bei Mahler et al. angewandt und dadurch sind die Versuche nicht direkt miteinander vergleichbar. Es wird deutlich, wie sehr auch die gewählte Stressbedingung und die entsprechenden Versuchsparameter das Ergebnis beeinflussen können. Aus diesem Grund sollte es allgemeingültige Stressmodelle für derartige Untersuchungen geben.

Auch Kinetiken könnten von der gewählten Stressmethode abhängig sein. Gemeinsamkeiten in früheren Publikationen können in dem Aggregationsmechanismus ausgemacht werden, welcher, ausgelöst durch Rührstress, erst mittelgroße Aggregate und schließlich große Präzipitate hervorbringt [Kiese et al. 2008; Lahlou et al. 2009]. Dies kann durch die hier gezeigten Versuche bestätigt werden. Es entstanden dabei kaum lösliche Aggregate (< 0,3 % bis 48 h, siehe Anhang A4, Tab. A.4), die dann noch weiter aggregierten, sondern es bildeten sich direkt nur unlösliche Aggregate, die die Lösung bereits nach 5 h sehr trübten (Abb.4.1.1; 4.1.2; 4.1.7; 4.1.9). Der geringe Temperatureinfluss auf das Rührergebnis ist ein weiterer Aspekt, der früher schon beobachtet werden konnte [Kiese et al. 2008].

Abschließend lässt sich festhalten, dass es wichtig ist, immer gleiche Versuchsparameter einzuhalten, da anderweitig keine vergleichbaren Ergebnisse generiert werden können. Nicht

nur die Rührgeschwindigkeit, auch die Füllmenge hat einen entscheidenden Einfluss auf das Analysenergebnis.

4.1.2 Schüttelstress: Einfluss verschiedener Schüttel-Parameter auf die Stabilität eines monoklonalen Antikörpers

In Kapitel 4.1.1 konnte gezeigt werden, dass Rühren als physikalische Stressmethode eingesetzt werden kann, um die Stabilität verschiedener Formulierungen zu vergleichen, allerdings mit einer z.T. schlechten Reproduzierbarkeit. Im folgenden Kapitel soll das Schütteln als Stressmethode untersucht werden, da Schütteln häufig zum Abschätzen von physikalischen Instabilitäten verwendet wird [Mahler et al. 2005b; Wang et al. 2008b]. Das Ziel der im Folgenden vorgestellten Versuche war es ebenfalls, eine diskriminierende Methode zu finden.

4.1.2.1 Füllmenge innerhalb der Vials

Der Einfluss durch Veränderung der Füllmengen wurde mit einer PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml bei pH 7,2 untersucht. Geschüttelt wurde in 2 ml-Vials mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 U/min und 250 U/min. Es wurden die Füllmengen 0,5, 0,7, 1, 2 und 3 ml verwendet. Proben wurden nach 0, 5, 24, 48 und 120 h entnommen.

Wie zu erwarten war, wurden die Schüttelproben mit zunehmender Schüttelzeit trüber. Allerdings konnten Unterschiede hinsichtlich der Füllmenge beobachtet werden (Abb. 4.1.12). Die Füllmenge 1 ml zeigte die stärkste Trübung, wenn mit 200 U/min geschüttelt wurde. Sowohl mit zunehmendem wie auch mit abnehmendem Füllungsgrad der Vials nahmen die Trübungswerte bei dieser Schüttelintensität ab. Visuell konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden. Da die Trübung ein Maß für die Bildung von Präzipitaten und großen Aggregaten ist, bedeutet dies, dass bei einer Füllmenge von 1 ml die meisten Aggregate entstanden waren. Diese Beobachtung konnte mittels SEC bestätigt werden (Abb. 4.1.12). Hier konnte der stärkste Monomergehaltsabfall ebenfalls bei der Füllmenge von 1 ml detektiert werden. Die Monomergehalte bei längeren Schüttelzeiten nahmen mit zunehmender und abnehmender Füllmenge zu. Dass es sich um eine nahezu gleiche Zunahme des Monomergehaltes mit zu- und abnehmenden Füllmengen handelte, ist in den kleinen eingesetzten Grafiken in Abb. 4.1.12 zu sehen, in der die Ergebnisse nur für 48 h aufgeführt sind.

Bei einer schnelleren Schüttelgeschwindigkeit von 250 U/min konnte eine leichte Verschiebung des höchsten Trübungswertes zu einer Füllmenge von 0,7 ml beobachtet werden (Abb. 4.1.12). Abgesehen von 5 h und 24 h Stresszeit, nach welcher ebenfalls 1 ml Füllmenge als die trübste Lösung ausgemacht werden konnte, zeigte der Versuch bei

250 U/min eine Verschiebung des stärkeren Stresses zu geringeren Füllmengen. Im Gegensatz zu dem Versuch bei 200 U/min, bei welcher 3 ml und 0,5 ml Füllmenge dieselben Instabilitäten hervorbrachten, zeigte die Füllmenge von 3 ml bei 250 U/min eine geringere Trübung und auch einen höheren Monomergehalt als die 0,5 ml-Probe. Durch eine Erhöhung der Schüttelgeschwindigkeit verschob sich also das Stressmaximum leicht zu geringeren Füllmengen. Grund dafür könnte sein, dass sich die Luft-Wasser-Grenzfläche durch eine schnellere Schüttelbewegung innerhalb der Vials mit geringen Füllmengen vergrößerte und somit ein stärkerer Stress entstand. Ähnliches konnte durch Füllmengenreduzierung im Rührversuch in Kapitel 4.1.1 auch festgestellt werden.

Dass nach 120 h der Trübungswert der 1 ml Füllmengenprobe bei 250 U/min so gering war, lag daran, dass hier so viele Aggregate entstanden waren, dass sie in einer Art „Schaum“ an der Glasoberfläche hingen. Dieser Effekt spiegelt sich im Monomergehalt wieder, denn nach 120 h war in der Lösung, die mit 1 ml Füllmenge und 250 U/min geschüttelt wurde, kein Monomer mehr zu detektieren.

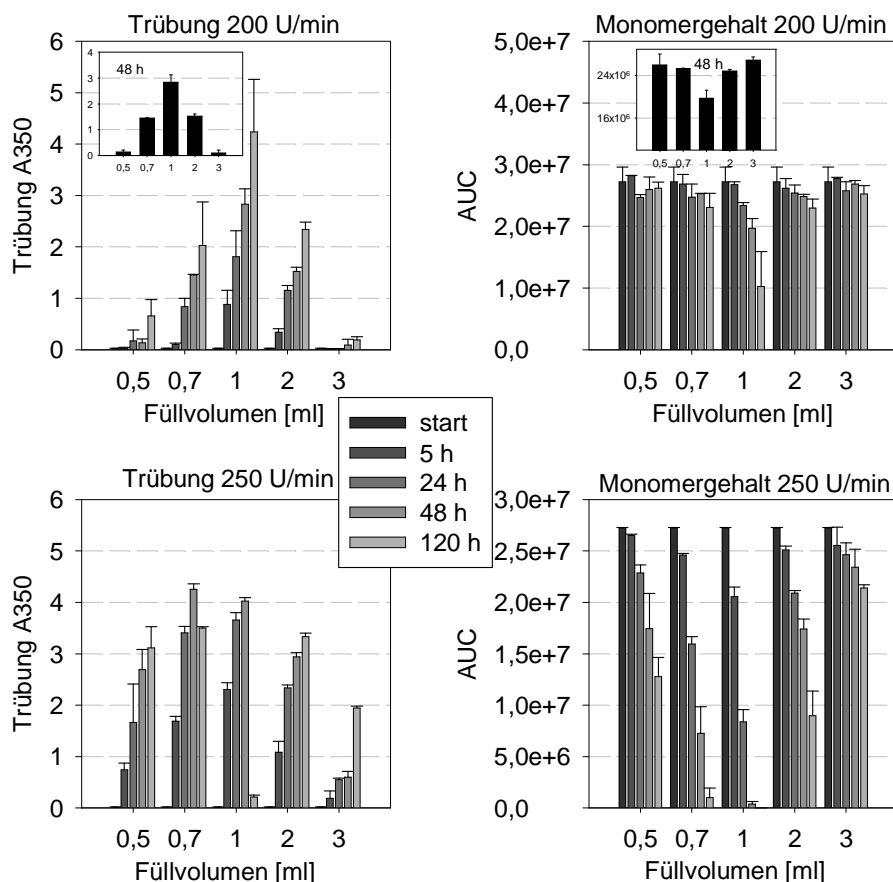


Abbildung 4.1.12 Trübungswerte und absolute Monomergehalte von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml (pH 7,2) nach Schütteln bei 200 U/min und 250 U/min für unterschiedlichen Zeiten mit unterschiedlichen Füllmengen

Die mikroskopischen Aufnahmen nach 48 h zeigen, dass bei einer Geschwindigkeit von 250 U/min „fasrige“ Präzipitate entstanden sind (Abb. 4.1.13). Diese Beobachtung trifft bei 200 U/min auch zu, allerdings nicht bei 0,5 und 0,7 ml Füllung. Hier entstanden „kugelförmige“ Präzipitate, erst bei höheren Füllmengen sahen die Präzipitate ebenfalls „fasrig“ aus. Interessant ist auch, dass bei 200 U/min sowohl die Proben mit 0,5 ml wie auch die mit 3 ml Füllmenge die geringste und die mit 1 ml eine recht große Anzahl an Präzipitaten zeigten. Dieses Ergebnis stimmte mit den Ergebnissen der anderen analytischen Methoden überein. Wie auch schon bei den Monomergehalten beobachtet, verschob sich dieses Verhältnis bei 250 U/min zu geringeren Füllmengen. Proben, geschüttelt mit 250 U/min,

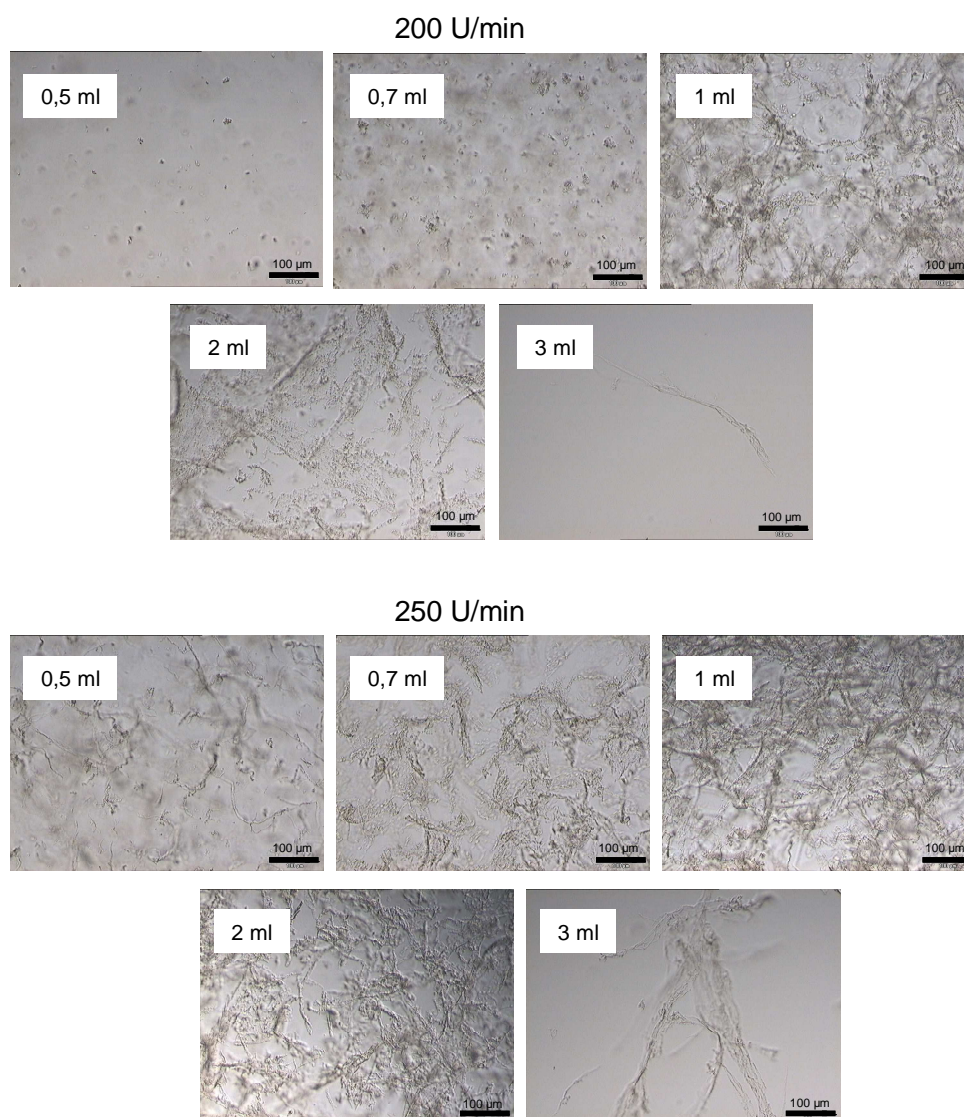


Abb. 4.1.13 Mikroskopaufnahmen von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml nach 48 h Schütteln mit verschiedenen Füllmengen bei 200 U/min und 250 U/min

zeigten einen höheren Präzipitatgehalt in den 0,5 ml- als in den 3 ml-Proben und enthielten auch schon mit 0,5 ml Füllung „fasrige“ Präzipitate. Diese Beobachtung zeigt, dass höhere Füllmengen nicht so sensitiv auf Schüttelgeschwindigkeitserhöhungen reagieren wie geringere Füllmengen.

Nach den Instabilitäten zu urteilen, konnte mit 1 ml Füllmenge der stärkste Stress beobachtet werden. Eine abnehmende Stressintensität mit Zunahme der Füllmenge wurde bereits in der Literatur beschrieben [Kiese et al. 2008]. Dass jedoch eine Abnahme der Füllmenge ab einem bestimmten Punkt denselben Effekt hat, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei geringem Füllvolumen die Bewegung der Lösung innerhalb des Vials sehr gering ist, da die Benetzung der Glasoberfläche relativ hoch ist. So wird die Grenzfläche zur Luft nicht häufig genug erneuert bzw. es entsteht kaum Scherung oder Bewegung. Höhere Füllmengen haben einen stabilisierenden Effekt, weil eine geringere Luftmenge innerhalb des Vials vorhanden ist und somit eine geringere Luft-Wasser-Grenzfläche entsteht. Luft-Wasser-Grenzflächen stellen Stress für die Proteine dar [Martin et al. 2002], ebenso wie eine Kombination von Luft-Wasser-Grenzflächenstress mit Scherung [Bee et al. 2009b; Maa und Hsu 1997; Patapoff und Esue 2009].

Hinsichtlich einer begrenzten Probenmenge innerhalb von „small scale“-Versuchen und einer gewünschten schnellen Aussage nach möglichst kurzer Zeit wurde mit der 1 ml-Füllmenge in den nächsten Versuchen weitergearbeitet. Diese Füllmenge entsprach ungefähr einer halben Füllung des Vials (nach Herstellerangaben).

4.1.2.2 Vialgröße und Vialtyp/verschiedene Antikörper

Verschiedene Vialgrößen und -typen wurden im Folgenden anhand zweier Antikörperlösungen getestet. Die Antikörperlösungen waren PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung mit 2 mg/ml (pH 7,2) und EMD 72000 mit ebenfalls 2 mg/ml in PBS (pH 7,2). Es wurden die schon oben verwendeten 2 ml-Vials ebenso wie 6 ml-Vials, 1,5 ml-HPLC-Vials und 0,8 ml-HPLC-Vials als Testgefäße eingesetzt (Tab. 3.1.3). Da die oben dargestellten Ergebnisse zeigten, dass bei ungefähr halber Füllmenge die stärksten Instabilitäten beobachtet werden konnten, wurden die Versuche hier mit halber Füllmenge durchgeführt (0,4 ml, 0,75 ml, 1 ml, 3 ml). Verwendet wurden dieselben Schüttelzeiten wie in dem eben dargestellten Versuch. Es wurde mit 250 U/min geschüttelt.

Für die beiden verschiedenen Antikörperlösungen konnte für alle Schüttelzeitpunkte ein ähnliches Aussehen beobachtet werden (Abb. 4.1.14), aber es wurden Unterschiede

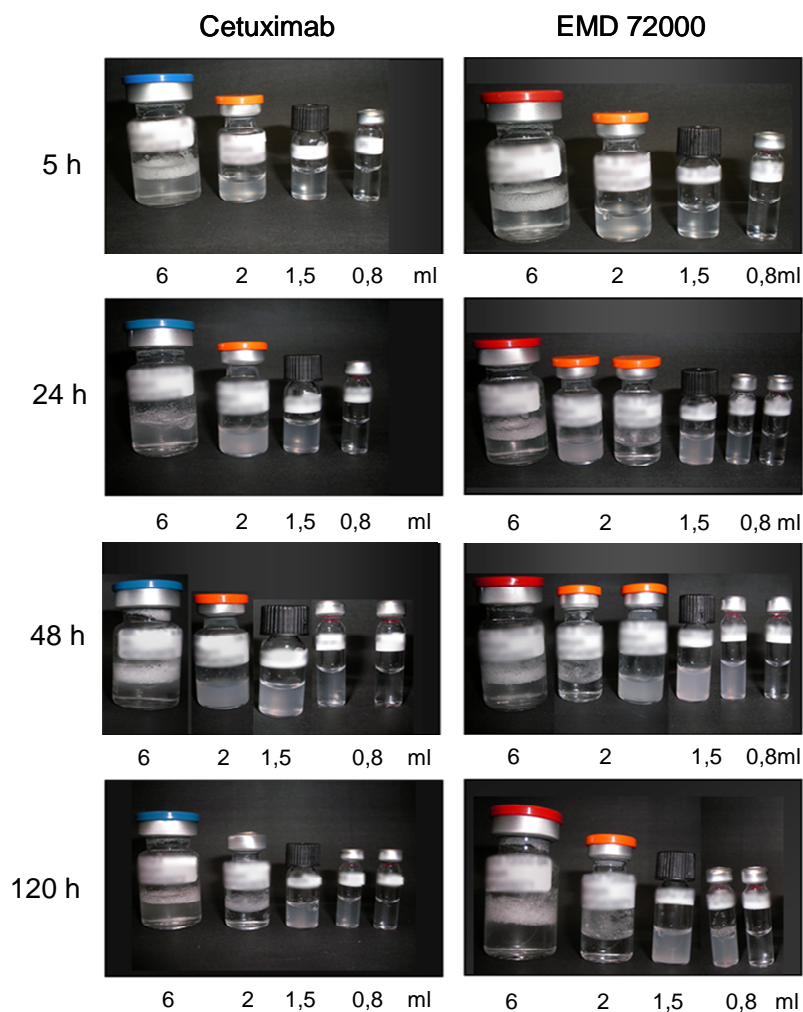


Abbildung 4.1.14 Visuelle Kontrolle nach verschiedenen Stresszeiten für PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung mit 2 mg/ml und PBS-gepufferte EMD 72000-Lösung mit 2 mg/ml geschüttelt mit 250 U/min in verschiedenen Vials

hinsichtlich der Vialgröße deutlich. Die 6 ml-Vials z.B. zeigten in allen ihren Lösungen schon nach 5 h Stresszeit Schaum. Dies deutet darauf hin, dass hier beim Schütteln viel Luft in die Lösung eingearbeitet wurde (siehe Anhang A3, Abb. A.3.3).

Ähnliche Beobachtungen sind auch in der Literatur zu finden [Maa und Hsu 1997]. Der Schaum (Abb. 4.1.14) kann sehr viele Präzipitate enthalten, die in dem hier gezeigten Versuch auch unter dem Mikroskop zu detektieren waren (Abb. 4.1.15 kleines Foto in Bild unten rechts). Diese Präzipitate konnten dann nicht mehr mittels Trübungsmessung in der Lösung erfasst werden. Auch in den 2 ml-Vials wurde zunächst eine ansteigende Trübung, dann aber nach 120 h ebenfalls Schaum in der visuellen Kontrolle beobachtet. Hier wurden die Präzipitate so groß, dass sie sich an der Glaswand oder an der Luft-Wasser-Grenzfläche anhefteten und sich die Lösung dadurch wieder klärte. Diese Beobachtungen konnten mittels

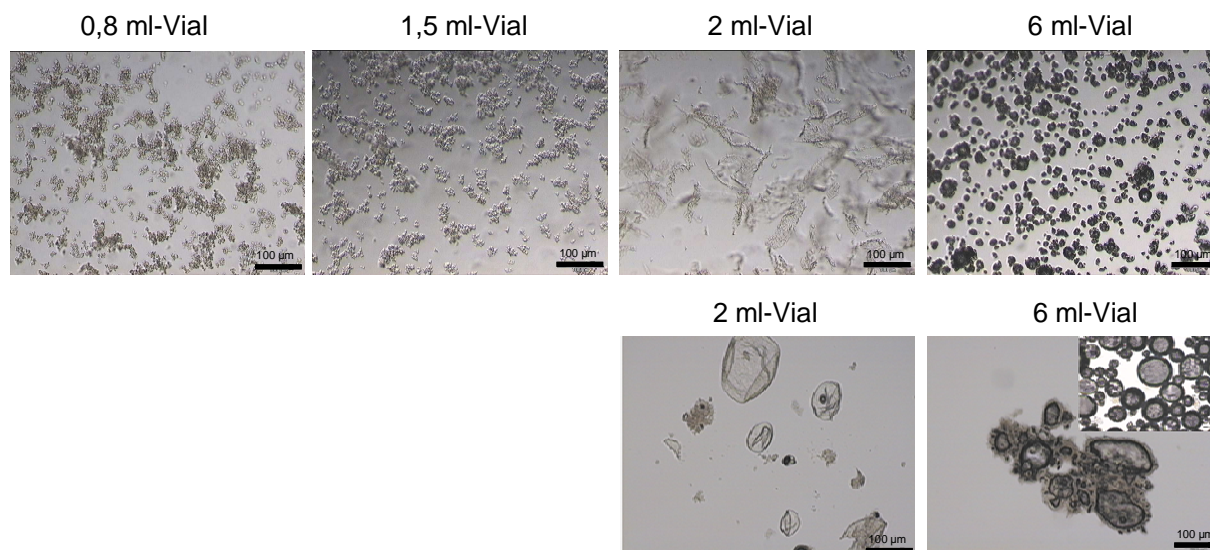


Abbildung 4.1.15 Mikroskopische Aufnahmen von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 2 mg/ml geschüttelt mit 250 U/min in verschiedenen Vials (oben) 48 h, (unten) 120 h (Aggregatveränderung nur im 2 ml- und 6 ml-Vial); kleines Foto im Bild unten rechts zeigt Aufnahme aus dem Schaum.

Mikroskop bestätigt werden (Abb. 4.1.15). In der 48 h-Probe zeigte das 2 ml-Vial noch „fasrige“ Präzipitate (Trübung) und nach 120 h waren diese zu „Klumpen“ geformt und schwammen auf (geringe Trübung). In den kleineren HPLC-Vials konnte eine mit zunehmender Schüttelzeit erhöhte Trübung visuell und mikroskopisch festgestellt werden, die aber für die 0,8 ml-Vials innerhalb der Versuchs-Triplets sehr unterschiedlich ausfiel. Dies konnte für beide Antikörperlösungen so beobachtet werden (Abb. 4.1.14). Vermutlich bewegte sich die Flüssigkeit in den Vials sehr unterschiedlich, was auch visuell während des Schüttelvorgangs beobachtet werden konnte. Im Mikroskop konnte nur für das 2 ml-Vial nach 48 h eine „fasrige“ Struktur der Präzipitate erkannt werden. Die Lösungen innerhalb des 6 ml-Vials zeigten sehr viele Luftblasen (siehe auch Hochgeschwindigkeitsaufnahmen im Anhang A3, Abb. A.3.3), die 0,8- und 1,5 ml-Vials eher „kugelförmige“ Präzipitate.

Die Ergebnisse der Schüttelversuche zeigen, dass die Unterschiede im Aggregationsverhalten durch das Vial bedingt waren und weniger durch den Antikörper. Die zwei hier untersuchten Antikörper scheinen trotz leichter Unterschiede in ihrer Primärstruktur untereinander ähnliche Ergebnisse zu liefern. In der Literatur konnte bei wesentlich kleineren Proteinen auch schon das Gegenteil gezeigt werden [Oliva et al. 2003]. Diese ähnlichen Ergebnisse der zwei Antikörper konnten auch mittels SEC bestätigt werden, welche nicht von einer Schaumentstehung beeinflusst wird (Abb. 4.1.16). Hier konnten im 2 ml-Vial nach 48 h keine Monomere mehr in der Lösung detektiert werden, da diese als Präzipitate aufgeschwommen waren. Auch zeigten die kleinen 0,8 ml-Vials wieder große Unterschiede innerhalb der

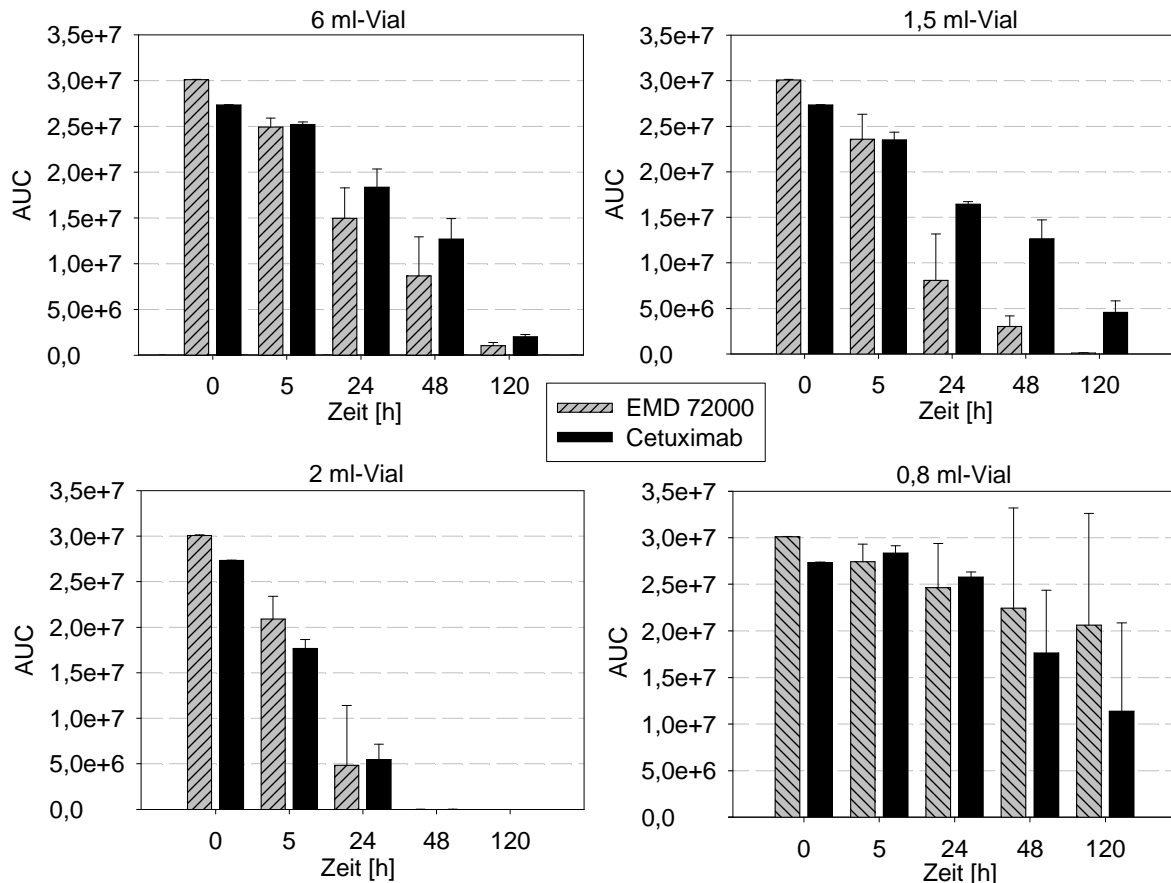


Abbildung 4.1.16 SEC-Monomergehalte von zwei PBS-gepufferten Antikörpern mit 2 mg/ml (pH 7,2) nach bestimmten Schüttelzeiten in unterschiedlichen Vials

Versuchs-Triplets, was in großen Standardabweichungen zum Ausdruck kam. Das 1,5 ml-Vial zeigte die geringste Übereinstimmung der beiden verschiedenen Antikörperlösungen. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass verschiedene Gefäße verschiedene Stressbedingungen schaffen und dadurch unterschiedliche Ergebnisse liefern. Gründe dafür könnten nicht nur unterschiedliche Strömungen der Lösungen und daraus entstehende Scherungen innerhalb des Vials [Oliva et al. 2003], sondern auch verschiedene Materialien [Bee et al. 2009a; Sluzky et al. 1991] sein. Die HPLC-Vials sind nicht als Packmaterialien für parenterale Lösungen vorgesehen und enthalten andere Materialien in den Verschlüssen (Tab. 3.1.3). Das 2 ml- und das 6 ml-Vial hingegen sind hinsichtlich der verwendeten Materialien gut miteinander vergleichbar und repräsentieren das favorisierte Packmittel (Tab. 3.1.3).

Für jede Vialgröße ist die Luft-Wasser-Grenzfläche während des Schüttelvorgangs eine andere. Ein größerer Durchmesser des Vials führt zur stärkeren Durchmischung der Flüssigkeit während des Schüttelvorgangs innerhalb des Vials und dadurch kann mehr Luft eingeschlossen werden bzw. die Luft-Wasser-Grenzfläche vergrößert sich (siehe Anhang A3, Abb. A.3.3), was zur Schaumbildung führen kann. Wenn man das Verhältnis von Flüssigkeit

zu Luft betrachtet, ergibt sich für jedes Vial ein anderer Quotient (6 ml-Vial: $\sim 0,32$; 2 ml-Vial: $\sim 0,26$; 1,5 ml-Vial: $\sim 0,42$; 0,8 ml-Vial: $\sim 0,48$). Dies könnte einen weiteren Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen, denn der Luftgehalt innerhalb des Vials korreliert mit dem Monomergehaltsabfall in der Lösung (die stärksten Instabilitäten sind im 2 ml-Vial zu beobachten, abnehmend über das 6 ml-Vial und 1,5 ml-Vial bis hin zu dem 0,8 ml-Vial zu sehen).

Es kann also abschließend festgehalten werden, dass das 2 ml-Vial einen ähnlichen Monomergehaltsabfall für beide Antikörperlösungen zeigte. Außerdem ist es das kleinste Vial, das für parenterale Lösungen als Packmaterial benutzt werden kann und damit repräsentativer als die HPLC-Vials. Die Füllmenge von 1 ml ist außerdem für „small scale“-Versuche ein ausreichendes Volumen. Das 6 ml-Vial ist auf Grund von Schaumbildung eher ungeeignet und benötigt relativ große Probenmengen. Das 1,5 ml-Vial zeigte unterschiedliche Monomergehalte für die zwei verschiedenen Antikörper und das 0,8 ml-Vial ließ sehr große Unterschiede innerhalb der Versuchs-Triplets erkennen, was eine schlechte Reproduzierbarkeit bedeutet. Aus diesem Grund wurden die folgenden Versuche mit dem 2 ml-Vial und 1 ml Füllmenge durchgeführt.

4.1.2.3 Schüttelgeschwindigkeit

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit anhand einer Cetuximab-Lösung mit 2 mg/ml in PBS (pH 7,2) untersucht. Dafür wurde das 2 ml-Vial mit 1 ml Füllmenge verwendet. Schüttelgeschwindigkeiten von 150, 200 und 250 U/min wurden mit den gleichen Schüttelzeiten wie in den vorherigen Versuchen getestet.

Abb. 4.1.17 zeigt die Trübungswerte und Monomergehalte nach verschiedenen Schüttelzeiten bei diesen unterschiedlichen Geschwindigkeiten im Vergleich. Es fällt auf, dass ein Schütteln mit einer Geschwindigkeit von 150 U/min kaum eine Trübung und fast keinen Monomergehaltsabfall bewirkte. Diese Schüttelgeschwindigkeit schien für die vorgegebene Zeitspanne von 120 h zu klein zu sein, um größere Instabilitäten zu erzeugen. Obwohl in diesem Versuch eine weniger stabile Formulierung verwendet wurde, bei welcher in einer angemessenen Zeit (120 h) Instabilitäten zu detektieren sein sollten, konnte hier eine Art Schwelle, die notwendig wäre, um schnelle Aggregation voranzutreiben, nicht erreicht werden. Die Bewegungen und Strömungen innerhalb des Vials waren hier anscheinend zu klein. Wurde die Schüttelgeschwindigkeit jedoch erhöht, konnten Instabilitäten beobachtet werden. Schütteln mit 200 U/min führte zu einem erheblichen Trübungsanstieg in der

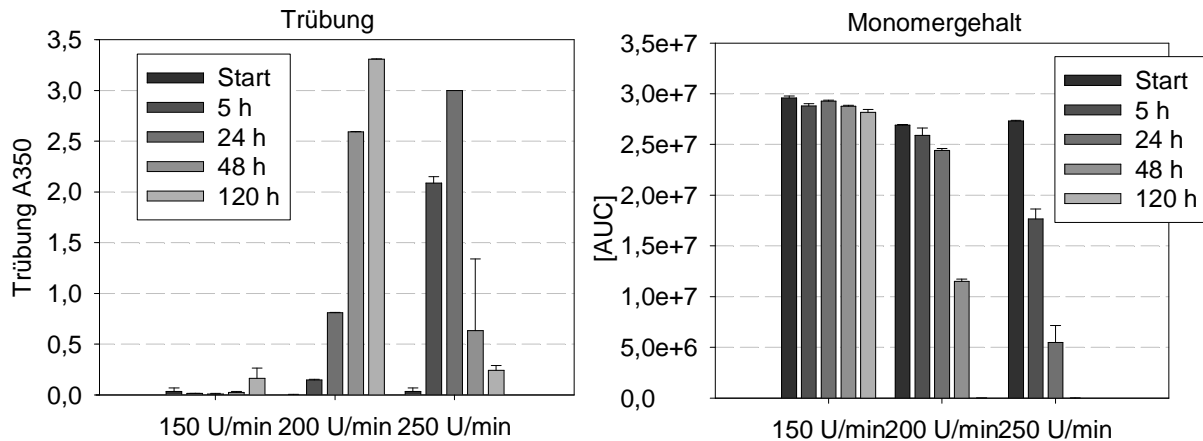


Abbildung 4.1.17 Trübungsergebnisse und SEC-Monomergehalte von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 2 mg/ml nach verschiedenen Schüttelzeiten bei verschiedenen Schüttelgeschwindigkeiten

Lösung: also waren hier unlösliche Aggregate entstanden. Zusätzlich nahm der Monomergehalt bis 48 h in einem angemessenen Rahmen ab. Die Schüttelgeschwindigkeit 250 U/min ergab einen sehr schnellen Monomergehaltsabfall, so dass nach 48 h keine Monomere mehr zu detektieren waren. Die Trübung nahm hier sehr schnell zu, fiel dann aber wieder ab. Dieses Phänomen wurde oben schon beschrieben. Es handelte sich hierbei um die Entstehung großer Präzipitate, die aufschwammen, eine Art „Schaum“ bildeten und somit der Lösung entzogen wurden. Schaumbildung ist sehr hinderlich bei der Beurteilung einer Proteinlösung.

4.1.2.4 Diskriminierende Bedingung

Zusammenfassend zeigten die bisher dargestellten Versuche bezüglich Füllmengen, Vialgröße und Schüttelgeschwindigkeit, dass eine halbe Füllmenge (1 ml) im 2 ml-Vial bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 U/min gute Ergebnisse lieferte. Mit dieser Methode konnten mit einer PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung detektierbare Instabilitäten erhalten werden, deren Ergebnisse auch übertragbar auf einen anderen Antikörper (EMD 72000) waren. Das Ziel dieser Versuchsserie war es, eine diskriminierende Bedingung zu finden, in welcher eine Marktformulierung noch stabil bleibt, während eine noch nicht vollständig entwickelte Formulierung Instabilitäten zeigt. Dies wurde unter Verwendung von Cetuximab-Marktformulierung und PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mithilfe der gerade beschriebenen Parameter getestet. Zusätzlich wurde bei 250 U/min geschüttelt.

Aus Abb. 4.1.18 geht klar hervor, dass bei 200 U/min die Marktformulierung in ihrem Monomergehalt stabil bleibt, während in der gepufferten Cetuximab-Lösung der

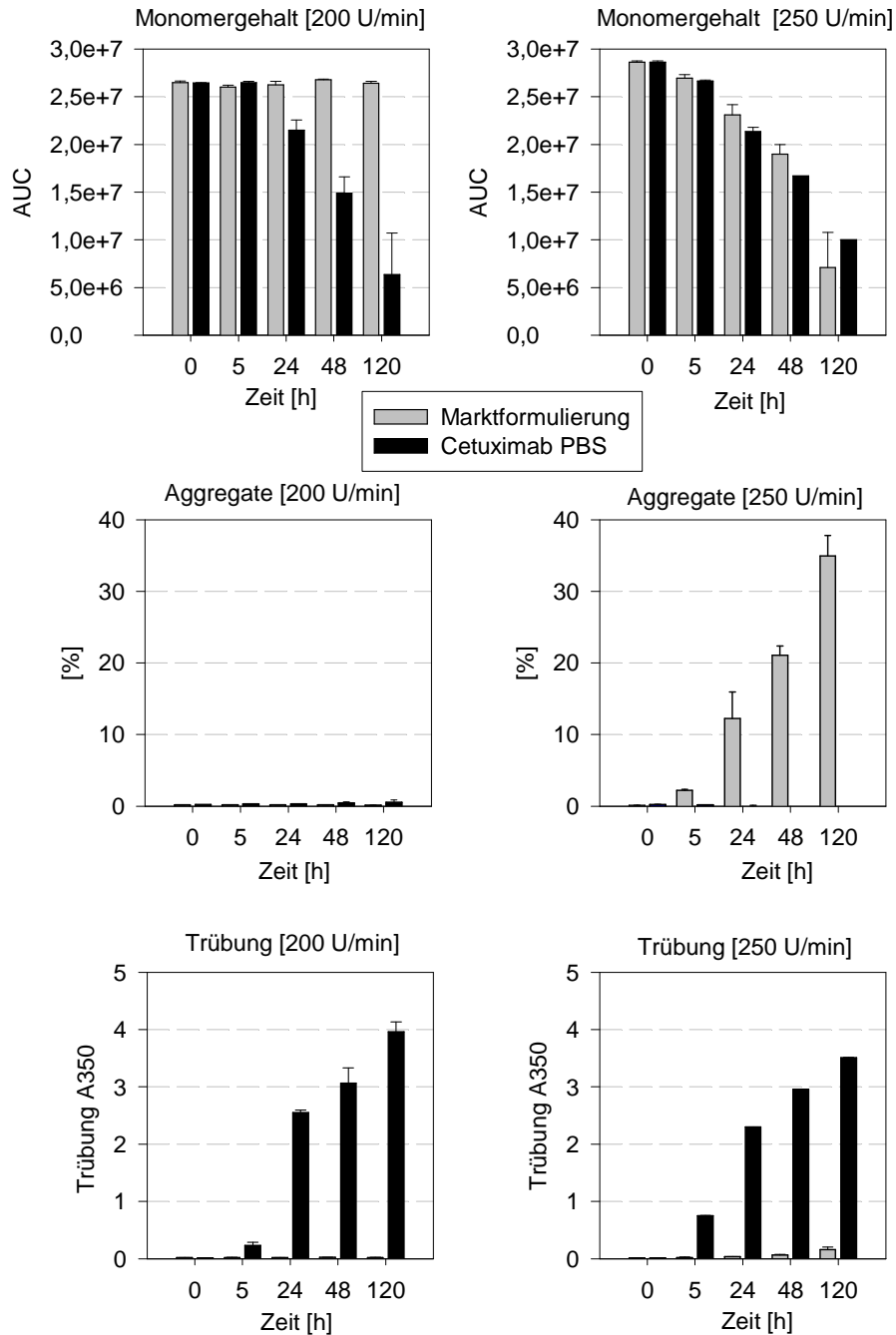


Abbildung 4.1.18 Monomergehalte (SEC), lösliche Aggregate (SEC) und Trübungswerte (UV/VIS-Spektroskopie) von Cetuximab-Marktformulierung im Vergleich zu PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml (pH 7,2) nach verschiedenen Stresszeiten und unter unterschiedlichen Schüttelbedingungen

Monomergehalt dagegen abfällt. Benutzt man jedoch die schnellere Schüttelgeschwindigkeit (250 U/min), um Zeit zu sparen, ist keine Diskriminierung mehr möglich. Beide Monomergehalte, sowohl der der Marktformulierung wie auch der der gepufferten Cetuximab-Lösung, fallen gleichzeitig ab, so dass keine Unterscheidung der beiden Formulierungen mehr gemacht werden kann (Abb. 4.1.18). Nur die Aggregate betrachtend, kann zwischen den beiden Formulierungen noch unterschieden werden. Die

Marktformulierung zeigte geschüttelt mit 250 U/min einen Anstieg an löslichen Aggregaten, während die gepufferte Lösung einen Anstieg der Trübung hervorrief. Im Fall der löslichen Aggregate waren kleine Aggregate entstanden, im Fall der erhöhten Trübungsmessung große Aggregate. Verantwortlich dafür war wahrscheinlich das Tween 80, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit den stärksten stabilisierenden Effekt in der Marktformulierung ausmachte und anscheinend kleine Aggregate stabilisiert [Katakam et al. 1995; Mahler et al. 2005b]. Dieser Effekt wurde auch schon in den Rührversuchen (Kapitel 4.1.1) beobachtet und in Kapitel 4.2.2 kann gezeigt werden, dass die alleinige Zugabe von Tween 80 zu der PBS-gepufferten Lösung den soeben diskutierten stabilisierenden Einfluss beim Schütteln hat.

Es sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass auch andere Hilfsstoffe, wie der eingesetzte Puffer und dessen pH-Bereich oder Salze einen stabilisierenden Einfluss auf das Protein haben können [Lahlou et al. 2009; Wang 1999]. Diese Hilfsstoffe wirken allerdings vor allem auch bei Lagerstudien oder andere Stressmethoden stabilisierend. In der Marktformulierung waren abgesehen von einem Tweenzusatz auch Glycin und ein anderes Puffersystem (Citrat-Puffer) mit einem pH von 5,5 im Vergleich zu der PBS-gepufferten Lösung mit pH 7,2 enthalten.

Die Schüttelintensität von 200 U/min scheint die richtige Geschwindigkeit zu sein, um in einem 2 ml-Vial mit 1 ml Füllmenge eine Diskriminierung zu bewirken. Die Marktformulierungs-Proben, die mit 200 U/min geschüttelt wurden, zeigten weder einen Anstieg in der Trübungsmessung noch eine Veränderung im Anteil der löslichen Aggregate. Im Gegensatz dazu konnte in der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung ein erheblicher Trübungsanstieg beobachtet werden. Durch diesen wie auch durch den Monomergehaltsabfall konnte die gepufferte Lösung sehr gut von der stabileren Marktformulierung unterschieden werden.

Nun ist allerdings noch fraglich, ob diese diskriminierende Bedingung auch für andere Antikörper angewendet werden kann, denn in der vorliegenden Studie wurde diese Bedingung im Wesentlichen anhand von Cetuximab (und EMD 72000) entwickelt. Aus diesem Grund wurde im folgenden Versuch die diskriminierende Bedingung im Vergleich zu einer anderen Marktformulierung (Zenapax[®], 5 mg/ml) und einem zweiten gepufferten Antikörper (EMD 72000, PBS; 5 mg/ml; pH 7,2) untersucht. In Abb. 4.1.19 sind die Ergebnisse im Vergleich zu Cetuximab aufgeführt.

Auch die zweite Marktformulierung (Zenapax[®]) zeigte keinen Monomergehaltsabfall über die 120 h Stresszeit. Weiterhin konnten keine löslichen Aggregate (Daten nicht dargestellt) oder Trübungsanstiege für Zenapax[®] beobachtet werden. Der zweite nur gepufferte Antikörper

hingegen verhielt sich ebenso wie das gepufferte Cetuximab. Er zeigte annähernd denselben Trübungsanstieg, ebenfalls keine löslichen Aggregate (Daten nicht dargestellt) und nahezu denselben Monomergehaltsabfall wie das gepufferte Cetuximab (Abb. 4.1.19). Natürlich müssten noch weitere Antikörper untersucht werden, um eine sichere Aussage zu erhalten, ob diese Methode allgemein auf Antikörper angewandt werden kann. Allerdings zeigen die hier vorliegenden Daten eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Antikörpern, was sehr für die Methode spricht. Die Methode bezieht sich auf Konzentrationen um 5 mg/ml und wurde bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Welchen Einfluss die Konzentration auf das Schüttelergebnis hat, wird in Kapitel 4.3.2 untersucht, der Temperatureinfluss soll im folgenden Abschnitt erörtert werden.

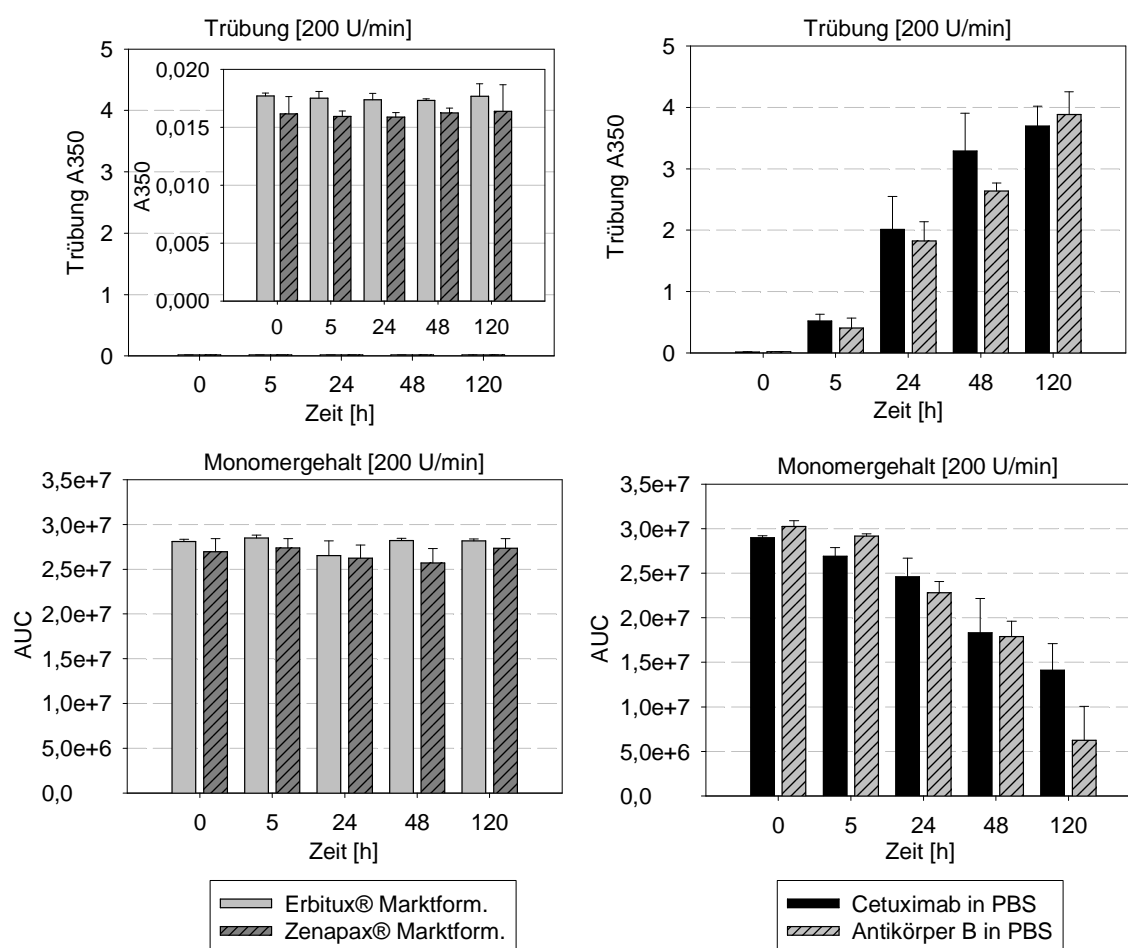


Abbildung 4.1.19 Trübungsmessungen (UV/VIS-Spektroskopie) und Monomergehaltsbestimmungen (SEC) von Cetuximab-Marktformulierung (Erbitux®), Zanolimumab-Marktformulierung (Zenapax®), PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung und PBS-gepufferter EMD 72000-Lösung (alle 5 mg/ml)

4.1.2.5 Einfluss der Temperatur

Im vorliegenden Kapitel wurde die zuvor entwickelte diskriminierende Schüttelstressmethode (1 ml Füllmenge im 2 ml-Vial, 200 U/min bis 120 h) mit der Cetuximab-Marktformulierung und der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung (beide 5 mg/ml) bei 4°C, 25°C und 40°C durchgeführt. Hierbei sollte der Temperatureinfluss auf das Schüttelergebnis beurteilt werden. Visuell und unter dem Mikroskop konnten für die Marktformulierung, unabhängig bei welcher Temperatur sie geschüttelt wurde, keine Unterschiede zu den Startwerten festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Die instabilere gepufferte Cetuximab-Lösung zeigte jedoch, wie zu erwarten war, erhebliche Unterschiede im Vergleich zu den Startwerten und auch Unterschiede bezüglich der Temperatur (Abb. 4.1.20, 4.1.21). Eine Diskriminierung war also bei allen Temperaturen zwischen den beiden Lösungen gegeben.

Mit steigender Stresszeit war in der PBS-gepufferten Lösung ein Trübungsanstieg zu beobachten. Dieser Anstieg fiel beim Schütteln mit 4°C geringer aus als beim Schütteln in der Wärme. Die Aggregate/ Präzipitate, die innerhalb der PBS-gepufferten Lösung entstanden waren, hatten ein unterschiedliches Aussehen unter dem Mikroskop (Abb. 4.1.21), was die unterschiedliche Trübung in der visuellen Kontrolle bedingen könnte. Die bei 4°C gestressten Proben zeigten „kugelförmige“ Aggregate, im Gegensatz zu den in der Wärme gestressten

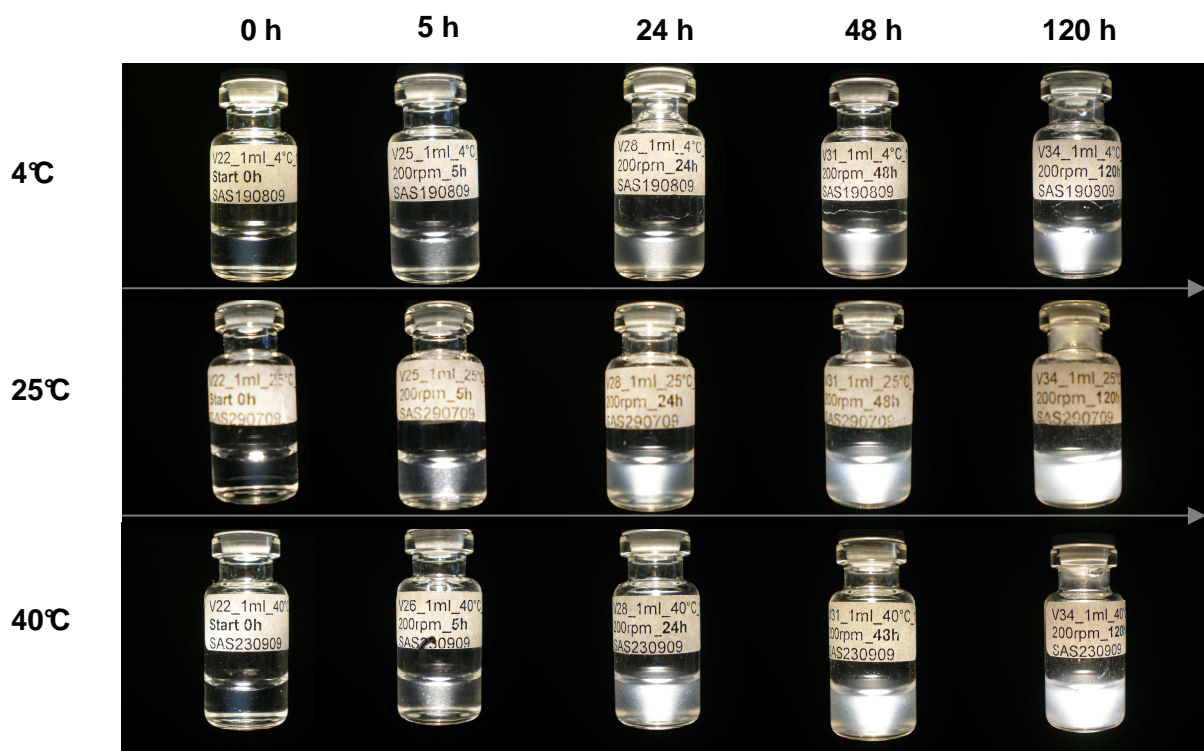


Abbildung 4.1.20 Visuelle Kontrolle der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung nach verschiedenen Stresszeiten bei verschiedenen Temperaturen (200 U/min, 2 ml-Vial, 1 ml Füllmenge)

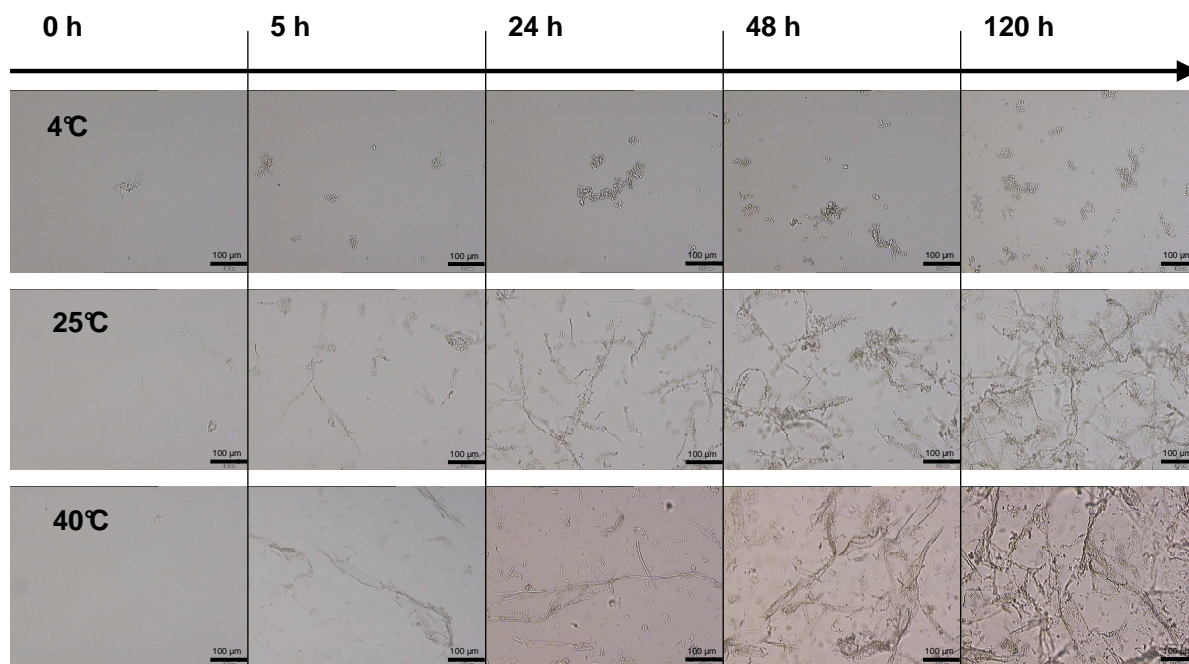


Abbildung 4.1.21 Mikroskopische Aufnahmen von der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung nach verschiedenen Stresszeiten bei verschiedenen Temperaturen (200 U/min, 2 ml-Vial, 1 ml Füllmenge); Messbalken zeigt 100 µm

Proben, die „fasrige“ Aggregate enthielten. Die Proben der Marktformulierung zeigten auch unter dem Mikroskop keine sichtbare Aggregation.

Auch die spektroskopische Trübungsmessung zeigte übereinstimmende Ergebnisse mit den mikroskopischen und visuellen Bildern (Abb. 4.1.22). Die bei 4°C geschüttelten Proben ergaben auch hier geringere Trübungswerte als die 25°C- und 40°C-Proben. Die Unterschiede zwischen 25°C und 40°C wiederum waren in der Trübungsmessung marginal. Auch in den Mikroskopaufnahmen sowie visuell war es schwer, zwischen den 25°C- und den 40°C-Proben zu unterscheiden. Dies würde bedeuten, dass es für einen noch nicht ausreichend formulierten Antikörper hinsichtlich der Aggregatbildung zwar einen Unterschied macht, ob er kalt (4°C) oder warm (25°C) geschüttelt wird, nicht aber ob bei 25°C oder 40°C. Allerdings wurde dies bisher nur an Cetuximab untersucht.

Betrachtet man die Monomergehalte, so ist zu erkennen, dass die gepufferte Lösung, wie eben besprochen, einen geringeren Monomergehaltsabfall bei 4°C (auf 84 % des absoluten Monomer-Startwertes nach 120 h) zeigt im Gegensatz zu 25°C (70 % nach 120 h) und 40°C (72 % nach 120 h) (Abb. 4.1.23). Die Marktformulierung blieb bei 4°C (99 %) und 25°C (99 %) in den Monomergehalten über die Schüttelzeit bis 120 h stabil, der Monomergehalt fiel aber dafür bei 40°C (auf 93 % nach 120 h) leicht ab. Dieser Abfall ist wahrscheinlich vorzugsweise der Temperatur geschuldet und kaum dem Schütteln, da die Kontroll-Proben,

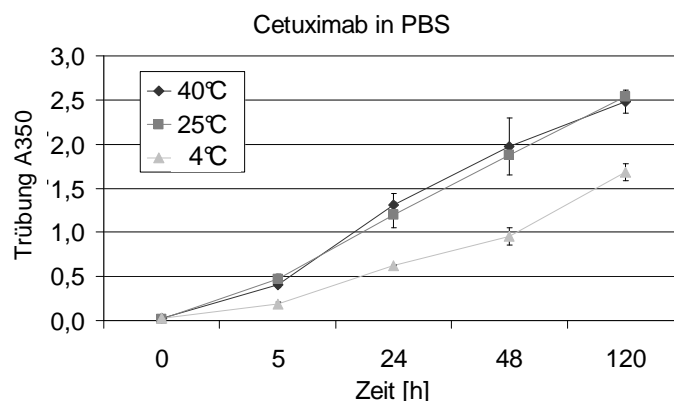


Abbildung 4.1.22 Trübungsmessung (UV/VIS-Spektroskopie) von PBS-gepufferten Cetuximab-Proben, geschüttelt bei unterschiedlichen Temperaturen nach unterschiedlichen Zeiten (200 U/min, 2 ml-Vial, 1 ml Füllmenge)

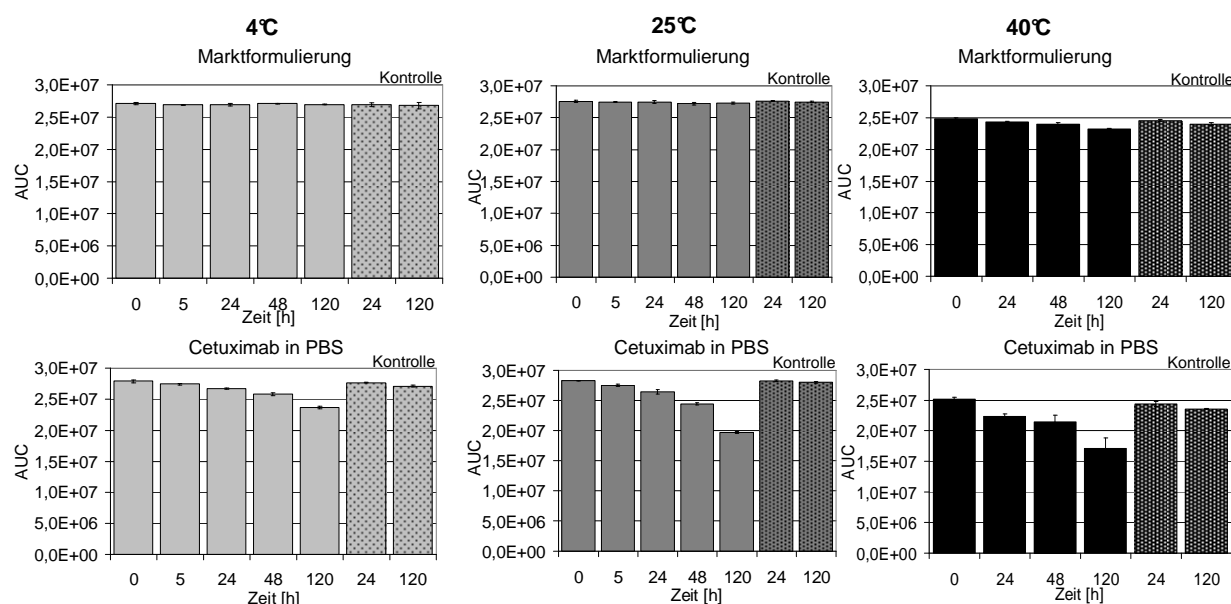


Abbildung 4.1.23 Absolute Monomergehalte (SEC) von Schüttelstressproben und ungeschüttelten Kontrollproben (Cetuximab-Marktformulierung; PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung) nach verschiedenen Zeiten bei verschiedenen Temperaturen (200 U/min, 2 ml-Vial, 1 ml Füllmenge)

die nicht geschüttelt wurden, ebenfalls leicht an Monomergehalt verloren. Auch die PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung zeigte in den Kontrollproben bei 40°C diesen leichten Abfall. Dennoch war auch bei 40°C eine Diskriminierung zwischen Marktformulierung und PBS-gepuffelter Lösung noch gegeben. Bei 25°C zeigte die Marktformulierung keinen Monomergehaltsabfall (99 %), die PBS-gepufferte Lösung hingegen den stärksten (70 %) in diesem Versuch. Die Temperatur von 25°C scheint also zur Diskriminierung gut geeignet zu sein. Schlussfolgernd haben die bisherigen Versuche, die bei RT durchgeführt wurden, eine gute Aussagekraft.

Wie an den Kontrollproben zu sehen war, konnten mittels SEC bis 25°C keine Temperatureffekte für die hier verwendete Schütteldauer detektiert werden. Um die chemischen Instabilitäten, die bei Wärmestress häufig auftreten, besser beurteilen zu können, wurden auch eine SDS-PAGE (siehe Anhang A5, Tab. A.5) sowie eine IEF durchgeführt, die aber keine Unterschiede zu den Startwerten für die Schüttel- und die Kontrollproben aufzeigten (auch nicht bei 40°C). Da mit der SDS-PAGE kovalente Aggregate detektiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass die entstandenen Aggregate nicht-kovalent sind. Somit kann im Hinblick auf Praktikabilität ohne Temperatureinfluss bei 25°C, also RT geschüttelt werden.

4.1.2.6 Zusammenfassende Diskussion - Schüttelstress

Die Wahl des Schüttelstresses hat einen erheblichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten eines Antikörpers in seiner Formulierung. Die zuvor aufgeführten Versuche zeigen, dass Schütteln in einem 2 ml-Vial, gefüllt mit 1 ml, mit einer Schüttelintensität von 200 U/min bei RT bis 48 h eine diskriminierende Methode darstellt, mit welcher zwischen einem noch nicht formulierten Antikörper und einem Antikörper in seiner Marktformulierung unterschieden werden kann. Erhöht man die Schüttelgeschwindigkeit, um dieses Ergebnis nach kürzerer Zeit zu erlangen, führt dies in beiden Lösungen zu einem Abfall des Monomergehaltes; eine Diskriminierung ist dann nicht mehr möglich.

Verschiedene stressbeeinflussende Parameter wurden getestet, wie z.B. die Füllmenge. Hier lieferte ein halb befülltes Vial die besten Ergebnisse hinsichtlich detektierbarer Instabilitäten. Zu hohe wie auch zu geringe Füllmengen reduzierten den Stress erheblich, so dass kaum noch Instabilitäten nachweisbar waren. Bei höheren Füllmengen ist die Stressreduktion auf die erniedrigte LWG zurückzuführen, bei den geringeren Füllmengen auf zu wenig Bewegung im Vial. Die Schüttelintensität darf nicht zu stark oder zu schwach sein, andernfalls können entweder keine Instabilitäten oder die völlige Aggregation des gesamten enthaltenen Antikörpers resultieren. Auch die Vialgröße ist entscheidend. Zu kleine Vials führen zu schlechter Reproduzierbarkeit, in zu großen Vials bildete sich Schaum beim Schütteln, was die Analyse dieser Lösungen sehr schwierig machte. Die Temperatur hatte nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis. Ein reiner Temperatureffekt konnte erst ab 40 °C gesehen werden. Die PBS-gepufferte Lösung zeigte allerdings einen etwas stärkeren Monomergehaltsabfall beim Schütteln bei RT im Vergleich zum Schütteln bei KT. In der Marktformulierung, die auch Tween enthält, konnte dieser leichte Unterschied zwischen RT und KT nicht gesehen werden, erst bei 40 °C war ein Unterschied zu beobachten.

Während der Untersuchungen zu den verschiedenen Parametern konnten als Folge der Instabilitäten vorzugsweise Aggregate (lösliche, unlösliche) detektiert werden, was auch in der Literatur als die häufigste Instabilität in Folge physikalischen Stresses, wie Schütteln oder Rühren, genannt wird [Patro et al. 2002; Wang 1999]. Allerdings konnten mit unterschiedlichen Schüttelprotokollen unterschiedliche Arten von Aggregaten detektiert werden, deren Entstehung bei Nichteinhaltung des Schüttelprotokolls der Formulierung zugeschrieben werden könnte. Aus diesem Grund ist die Wahl des Schüttelprotokolls sehr wichtig und bei einem schlecht gewählten Protokoll könnte der gewünschte stabilisierende Effekt evtl. nicht gesehen werden.

Die Bewegung der Flüssigkeit im Vial hängt von dem gewählten Schüttelprotokoll ab, aber auch von der Lösung selbst. Beispielsweise unterscheiden sich die hier verwendeten Lösungen in ihrer Oberflächenspannung (Tab. 3.1.1). Die Zugabe von Tween 80 erniedrigt die Oberflächenspannung, da Tween 80 oberflächenaktiv ist (Cetuximab-Marktformulierung ~43 mN/m; PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung ~60 mN/m). Diese Oberflächenaktivität erniedrigt die Proteinkonzentration an der Luft-Wasser-Grenzfläche, da das Tween selbst sich dort ansammelt und so stabilisiert. Eine veränderte Oberflächenspannung ergibt aber auch eine veränderte Benetzung der Glaswand und damit wieder eine veränderte Luft-Wasser-Grenzfläche. Auch die Protein-Konzentration hat einen Einfluss auf die Oberflächenspannung, da der Antikörper selbst auch oberflächenaktiv ist (~67 mN/m für PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung 2 mg/ml, verglichen mit ~60 mN/m für PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung 5 mg/ml, ~61 mN/m für PBS-gepufferte EMD 72000-Lösung 2 mg/ml verglichen zu ~56 mN/m für PBS-gepufferte EMD 72000 5 mg/ml).

Am bedeutsamsten zur Stabilisierung der Lösung gegen physikalischen Stress war sicherlich der Zusatz von Tween 80 [Arakawa und Kita 1999; Katakam et al. 1995] obwohl sich die Marktformulierung auch durch ihren pH-Wert, das Puffersystem und andere Hilfsstoffe wie Glycin von der PBS-gepufferten Lösung unterschied. Diese Hilfsstoffe wirken ebenfalls stabilisierend [Cleland et al. 1993; Usami et al. 1996; Zheng und Janis 2006].

4.1.2.7 Vergleich Rühren mit Schütteln

Werden Rühren und Schütteln als stabilitätsuntersuchende Methode verglichen, kann das Schütteln unter den ermittelten Bedingungen als reproduzierbarer und besser diskriminierend hervorgehoben werden. Rühren und Schütteln sind zwei verschiedene Stressmethoden, die auch unterschiedliche Instabilitäten/Aggregate hervorrufen [Kiese et al. 2008]. Die gerührten Proben werden meist als milchig beschrieben bzw. haben höhere Trübungswerte im Vergleich

zu den geschüttelten Proben [Mahler et al. 2005b]. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen kann diese Beobachtung erläutert werden (Abb. 4.1.24). Rühren führt zu sehr kleinen Aggregaten, die die Lösung schnell eintrüben und sie milchig aussehen lassen, auch wenn der Monomergehalt noch kaum abnimmt (siehe auch Kapitel 4.2.2): beim Schütteln hingegen bilden sich „fädrige“ große Aggregate. Dieser Unterschied kann mittels Lichtblockade auch in Kapitel 4.2.2 nochmals bestätigt werden.

Dass die Rührergebnisse nicht so gut reproduzierbar sind, könnte entweder an leichten Variationen der Rührbedingungen (Magnetrührstäbchen in Kombination mit unterschiedlich gewölbten Vialböden) liegen oder daran, dass die Rührplatte nicht auf allen Positionen gleichmäßig rührt. Durch die Reibung des Magnetrührstäbchens auf dem Vialboden könnte sich außerdem lokal die Temperatur erhöhen [Kiese et al. 2008]. Auch eine Erwärmung der Rührplatte wäre denkbar. Das Schütteln hingegen zeigt weniger Variationsmöglichkeiten, da die Vials, wie in den Hochgeschwindigkeitsaufnahmen auch noch gezeigt werden kann (Kapitel 4.2.1), mit einer sehr gleichmäßigen, reproduzierbaren Bewegung geschüttelt werden. Werden die äußeren Parameter wie Geschwindigkeit und Vialtyp eingehalten, zeigt diese Methode daher eine bessere Reproduzierbarkeit.

In der Literatur ist beschrieben, dass Tween gerührte Lösungen (im Gegensatz zu geschüttelten Proben) nur in höheren Konzentrationen oder nicht ausreichend stabilisieren kann [Kiese et al. 2008]. In den hier vorliegenden Rührversuchen konnte mit 0,01 % Tween 80 allerdings bei entsprechend gewählten Stressparametern eine Stabilisierung des Cetuximabs beobachtet werden (Kapitel 4.1.1). Allerdings handelte es sich um ein anderes Tween und andere Versuchsbedingungen als in der genannten Publikation. Aber zumindest bis 48 h zeigt diese Rührmethode fast keine Monomergehaltsabnahme für die tweenhaltigen Lösungen (sowohl Cetuximab-Marktformulierung als auch PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung mit 0,01% Tween 80) und stabilisierte somit (Abb. 4.1.8). Erst nach 120 h nahm auch in den tweenhaltigen Proben der Monomergehalt deutlicher ab. Die diskriminierende Methode, die für das Schütteln entwickelt wurde, ergab sogar bis 120 h keine Monomergehaltsabnahme in der tweenhaltigen Marktformulierung. Die besser stabilisierende Wirkung von Tween gegenüber Schütteln anstelle Rühren kann auch in Kapitel 4.2.2 bestätigt werden. Eine Erklärung dafür könnte die Stressart selbst sein. Da Tween vorzugsweise an Luft-Wasser-Grenzflächen wirkt, weil es sich dort anlagert, kann es beim Schütteln besser stabilisieren, da dort größere Luft-Wasser-Grenzflächen entstehen als beim Rühren. Auch die Füllmengenversuche von Schütteln und Rühren untermauern diese Erklärung, da bei größeren Luft-Wasser-Grenzflächen stärkere Monomergehaltsabnahmen detektiert werden konnten.

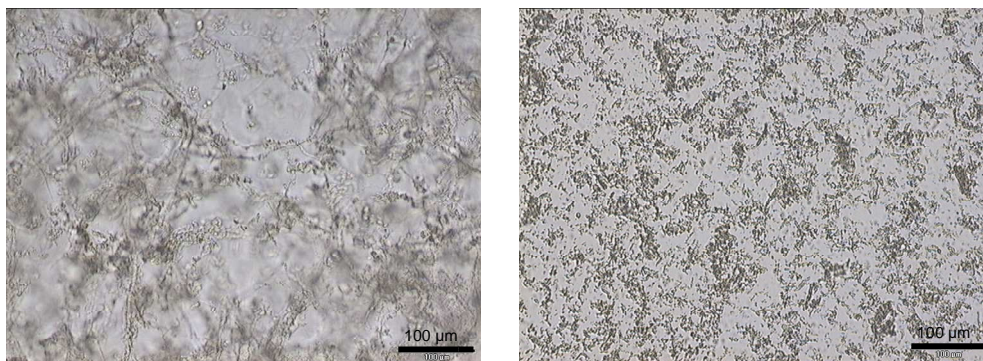


Abbildung 4.1.24 Mikroskopische Aufnahmen von (links) geschüttelter und (rechts) gerührter PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml nach jeweils 48 h (Schütteln: 200 U/min, 2 ml-Vial, 1 ml Füllmenge; Rühren: 120 U/min, 2 ml-Vial, 500 µl Füllmenge)

Nur auf die Ergebnisse des Schüttelversuches mit sehr geringen Füllmengen passt diese Hypothese nicht. Ein Temperaturanstieg von 5 auf 25°C zeigte beim Rühren kaum einen Einfluss, beim Schütteln hingegen schon. Diese Beobachtung stimmt mit bereits publizierten Daten überein [Kiese et al. 2008]. Was allerdings nicht mit den bisher in der Literatur gezeigten Daten übereinstimmt, sind die Unterschiede hinsichtlich löslicher Aggregate. Weder beim Rühren noch beim Schütteln mit der diskriminierenden Methode konnten nennenswerte Anteile an löslichen Aggregaten in den nicht-tweenhaltigen Lösungen detektiert werden, in der Literatur hingegen schon [Kiese et al. 2008]. Innerhalb der unlöslichen Aggregate in geschüttelten und gerührten Lösungen konnten lediglich unterschiedliche Formen und Größenunterschiede über das Mikroskop ermittelt werden. Das gleiche Ergebnis wurde für Rührproben von Erbitux[®] zuvor bereits publiziert [Lahlou et al. 2009].

4.2. Untersuchungen zur Ursache für Instabilitäten während des mechanischen Stresses

In dem folgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Ursache für die erhaltenen Ergebnisse nach Schüttelstress mittels verschiedener Erklärungsansätze untersucht. In der Literatur werden verschiedene Gründe diskutiert, warum Proteine während eines Schüttelvorganges aggregieren: am häufigsten wird der Grenzflächenstress zwischen Luft und Wasser genannt [Bee et al. 2009b; Maa und Hsu 1997]. Aber auch Scherstress wird als Ursache angeführt [Oliva et al. 2003]. Das Ausmaß des Grenzflächenstresses sowie die Stärke des Scherstresses in der Lösung lassen sich experimentell schwer ermitteln, dies ist aber mit Hilfe einer CFD-Simulation möglich. Das Verhalten der Proteine in der Lösung kann anhand einer CFD-Simulation nicht simuliert werden, aber die Kräfte, die während des Schüttelns innerhalb der Lösung auftreten, lassen sich beschreiben.

Trotz der Schwierigkeit, die Einflüsse der beiden Stressarten Scheren und Luft-Wasser-Grenzflächenstress voneinander zu trennen, wurde im zweiten Teil des vorliegenden Kapitels versucht, sie gesondert voneinander experimentell zu beobachten. Das Ziel war herauszufinden, welcher der beiden Einflüsse die Ursache für die Aggregatbildung während des Schüttelns sein könnte.

4.2.1 Versuch der Erklärung der Schüttelstressergebnisse anhand einer CFD-Simulation

4.2.1.1 Problemstellung, Vorgehens- und Auswertungsweise der CFD-Simulation

Einige aus Kapitel 4.1.2 ausgewählte Ergebnisse zum Schüttelstress sollen im Folgenden durch eine CFD-Simulation (Computational Fluid Dynamics) erklärt werden. Hierbei wird die Bewegung der Flüssigkeit strömungsdynamisch simuliert und z.B. die Scherung, die die Lösung erfährt, kann dann für die unterschiedlichen Füllmengen oder unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten berechnet werden. Zunächst ist von großem Interesse, welche Parameter überhaupt in die Simulation einfließen können. In Tabelle 4.2.1 sind diejenigen Parameter, die Einfluss auf die Bewegung der Flüssigkeit haben, aufgelistet. Viskosität, Dichte und Oberflächenspannung sind wichtige Parameter. Sie wurden für die PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung (mit 5 mg/ml) und für die Cetuximab-Marktformulierung bei 20°C gemessen (Tab. 3.1.1) und dem Simulationsprogramm vorgegeben. Die Parameter Konzentration, Temperatur und die Proteinart können in der Simulation nicht direkt berücksichtigt bzw. dem Programm vorgegeben werden. Eine Änderung dieser Parameter

verändert jedoch die zuvor genannten Stoffgrößen und könnte also über diese in die CFD-Simulation einbezogen werden. Konzentration, Temperatur und Proteinart sollten aber nicht Gegenstand der Untersuchungen sein. Änderungen der Schüttelintensität und Füllmenge können direkt in die Simulation einfließen. Da die Variation dieser beiden Parameter sehr interessante Ergebnisse hinsichtlich der detektierten Instabilitäten lieferte (Kapitel 4.1.2), wurden Simulationen bei 150, 200 und 250 U/min mit 1 ml sowie Simulationen bei 200 U/min mit Füllmengen von 0,5, 0,7, 1, 2 und 3 ml in dem 2 ml-Vial durchgeführt. Die Schüttelzeit konnte in diesem Fall nicht berücksichtigt werden, da die Bewegung, die aus einer rechts-/links-Schwingung besteht, sich periodisch wiederholt und sich nicht im Laufe der Zeit ändert. Insgesamt wurde die Bewegung allerdings über 1,5 Sekunden simuliert, was bei 200 U/min bedeutet, dass 5 Perioden (5 komplette rechts-/links-Schwingungen) simuliert wurden. Die erste Periode kann sich durch das „Einpendeln“ der Flüssigkeit von den danach kommenden Perioden unterscheiden. Die restlichen 4 Perioden sollten im Bewegungsablauf aber immer dieselben Werte aufzeigen. Der Hub dieser Bewegung ist ebenfalls von Bedeutung. Für die in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten Edmund-Bühler Schüttler SM 30 beträgt er 3 cm, und wurde dem Programm so vorgegeben. Der Einfluss einer Änderung der Vialgröße wäre auch interessant zu simulieren gewesen, allerdings hätte dann für jedes Vial ein eigenes Gitter generiert werden müssen, was zu aufwendig geworden wäre.

Wie bereits unter 3.2.4 beschrieben, wurde zunächst ein Gitter des zu simulierenden Gefäßes (2 ml-Vial) generiert und anschließend dieses Gitter in StarCD importiert. Nach Eingabe der restlichen Parameter wurde mit dem Programm StarCD dann auf Grundlage von Navier-Stokes-Gleichungen das Verhalten der Flüssigkeit während des entsprechenden Schüttelvorgangs berechnet. Da es nicht möglich war, eine stabile Simulation mit dem sehr detailgetreuen Gitter-Nachbau des 2 ml-Vials durchzuführen (abgerundete Flaschenkanten, detailgetreue Stopfeninnenseite im Flaschenhals), wurde eine Vereinfachung des 2 ml-Vial-Gitters für die Simulation verwendet (Abb. 3.1.2 unter Kapitel 3.2.4).

Ergebnisgrößen waren unter anderem Druck und Geschwindigkeit innerhalb der Lösungen zu verschiedenen Zeitpunkten der rechts-/links-Bewegung. Schubspannung (Scherung) sowie die entstandene Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Luft wurden durch zusätzliche Berechnungen ebenfalls als Ergebnisgrößen erhalten. Diese Ergebnisgrößen zeigten innerhalb des Vials, abhängig von den eingegebenen Parametern, zu jedem Zeitpunkt der Bewegung einen anderen Wert.

Tabelle 4.2.1 Parameter, die das Schüttelergebnis beeinflussen, und Möglichkeit ihrer Berücksichtigung in der Simulation

Parameter, die Ergebnis beeinflussen	Fließen direkt in Simulation ein	Kommentare
Viskosität	ja	Wird als Größe direkt in Simulation eingegeben
Dichte	ja	Wird als Größe direkt in Simulation eingegeben
Oberflächenspannung	ja	Wird als Größe direkt in Simulation eingegeben
Konzentration	nein	Viskosität, Dichte und Oberflächenspannung ändern sich durch diese Parameter
Temperatur	nein	
Proteinart	nein	
Schüttelintensität [U/min]	ja	Wird als Größe direkt in Simulation eingegeben
Füllmenge	ja	Luft/Flüssigkeitsverhältnis wird auch direkt eingegeben
Stresszeit	nein	Kann nur periodisch simuliert werden
Hub des Schüttlers	ja	Gerätekonstante (wird auch direkt eingegeben)
Vialgröße/-form	ja	Unterschiedliche Gitter müssten konstruiert werden

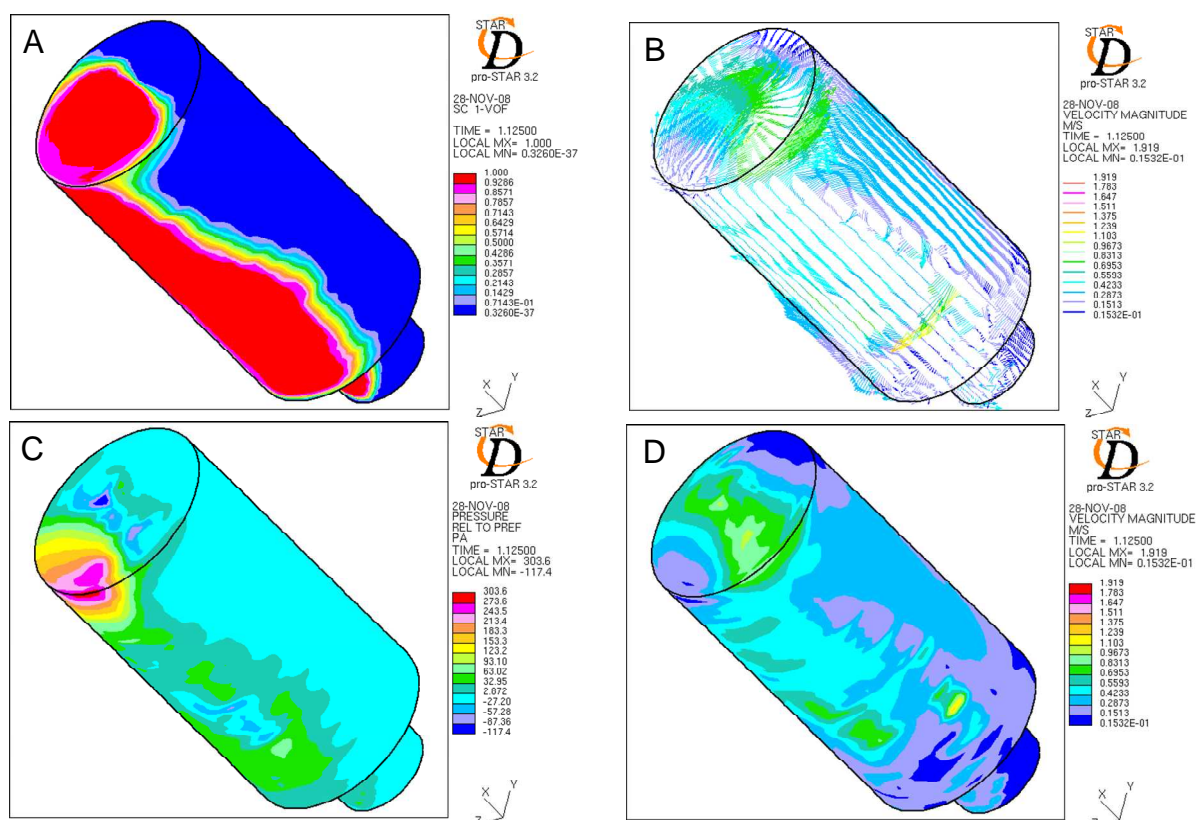


Abbildung 4.2.1 Bilder der CFD-Simulation von 1 ml Cetuximab-Marktformulierung (5 mg/ml) nach 1,125 Sek. Schütteln bei 200 U/min; A: VOF Luft-Flüssigkeitsverteilung (rot = Flüssigkeit; blau = Luft); B: Geschwindigkeiten mit Vektoren (Skala von rot (ca. 1,9 m/s) bis blau (ca. 0,015 m/s)); C: Druckverteilung (Skala von rot (ca. 300 N/m²) bis blau (ca. -120 N/m²)); D: Geschwindigkeitsverteilung ohne Vektoren (Skala von rot (1,9 m/s) bis blau (0,015 m/s))

In Abb. 4.2.1 sind exemplarisch Bilder von der Simulation des 2 ml-Vials, gefüllt mit 1 ml Cetuximab-Marktformulierung (entsprechende Stoffgrößen wurden dem Programm vorgegeben), geschüttelt bei 200 U/min nach 1,125 Sekunden dargestellt. Sie zeigen im ersten Bild (A) die Verteilung der Flüssigkeit zu diesem Schüttelzeitpunkt (VOF; rot = Flüssigkeit; blau = Luft) [Eswaran et al. 2009]. Im zweiten Bild (B) sind die Geschwindigkeiten, die zu diesem Zeitpunkt vorlagen, mit Vektoren innerhalb des Vials dargestellt. Im dritten und vierten Bild sind die Druckverteilung (C) und die Geschwindigkeiten ohne Vektoren (D) dargestellt.

Eine CFD-Simulation bedarf für das komplette Vial (216.000 Zellen im Gitter) einer sehr großen Rechenleistung. Da es sich bei dem Schüttelvorgang um eine Bewegung entlang der Hauptachse des Vials handelt, ist es auch möglich, ein halbes Vial (Abb. 4.2.2) zu simulieren und die Schnittstelle durch das Vial als Symmetrieachse zu definieren. Da eine laminare Strömung angenommen, also ohne Turbulenzen gerechnet wurde, sollten der Theorie nach keine Fehler entstehen, wenn nur ein halbes Vial simuliert wird. Es wird für die Berechnung des halben Vials nur die halbe Rechenleistung benötigt, da nur noch die Hälfte der Zellen des Gitters (108.000 Zellen) berechnet werden müssen. In Abb. 4.2.2 ist das Ergebnis der Simulation eines ganzen Vials (3 D-Simulation) im Vergleich zu der eines halben Vials (3 D halb-Simulation) nach 0,15, 0,24 und nach 0,3 Sekunden dargestellt.

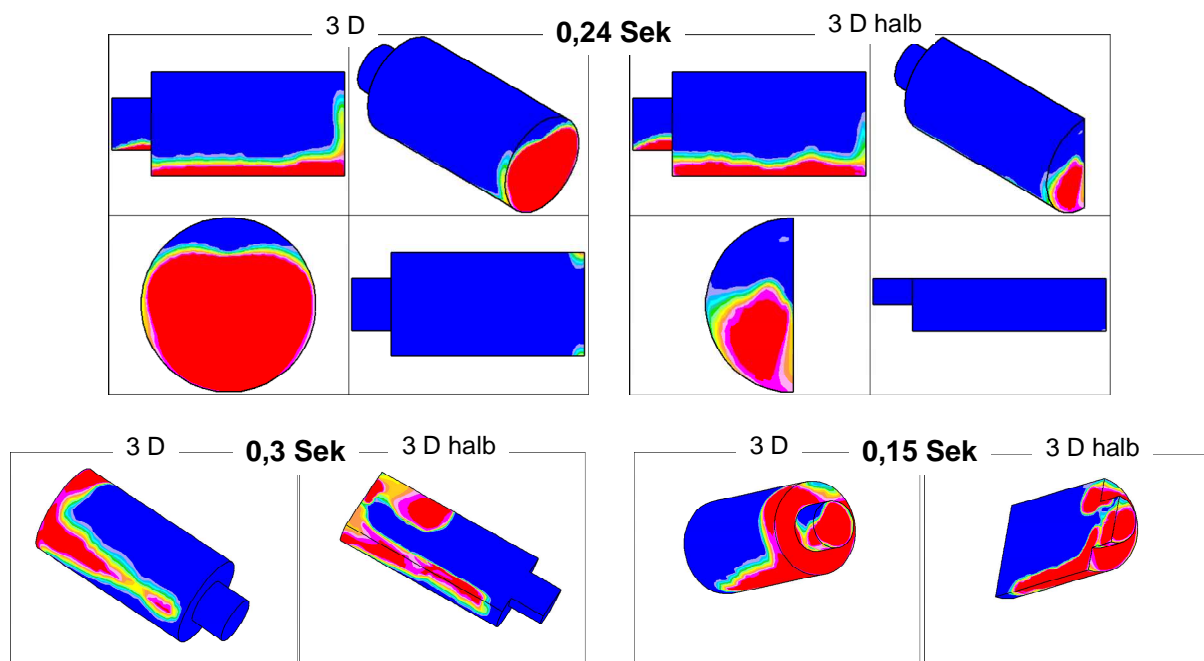


Abbildung 4.2.2 Vergleich von 3D und 3D halb-Simulationen anhand von 1 ml PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (5 mg/ml) nach verschiedenen Zeiten während des Schüttelns bei 200 U/min; VOF-Auswertung (rot = Flüssigkeit; blau = Luft); 0,3 Sek. Linksanschlag der Rechts-/Linksbewegung; 0,15 Sek. Rechtsanschlag der Rechts-/Linksbewegung

Bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 U/min stellt die Schüttelzeit von 0,15 Sekunden den Rechtsanschlag und 0,3 Sekunden den Linksanschlag innerhalb der Schüttelbewegung dar. Die Bilder in Abb. 4.2.2 zeigen also die Flüssigkeit während des Schüttelvorgangs zweimal an den Bewegungswendepunkten (0,15, 0,3 Sekunden) und einmal innerhalb der Bewegung (0,24 Sekunden). Es können zwar leichte Unterschiede zwischen 3 D- und 3 D halb-Simulationen ausgemacht werden, aber diese sind für eine solch komplexe Berechnung vertretbar. Aus diesem Grund wurden die im Folgenden diskutierten Daten ausschließlich aus 3 D halb-Simulationen generiert.

Um die in Abb. 4.2.1 und 4.2.2 gezeigten Bilder bzw. Ergebnisse nicht nur für einen Zeitpunkt, sondern über eine Bewegungs-Periode zusammenzufassen, wurden z.B. die auftretenden Grenzflächen für jeden Zeitpunkt über das komplette Vial gemittelt. So konnten die Mittelwerte verschiedener Simulationen z.B. für verschiedene Füllmengen über eine oder mehrere Perioden miteinander verglichen werden. In Abb. 4.2.3 werden z.B. drei verschiedene Schüttelintensitäten für die PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung (über Stoffgrößen in das Programm eingegeben) miteinander über mehrere Perioden verglichen.

Durch die großen Schwankungen (großen Amplituden) der Mittelwerte während der rechts-/links-Bewegung war es teilweise schwer, ein Ranking der verschiedenen Simulationen vorzunehmen (siehe Abb. 4.2.3). Aus diesem Grund wurden die Werte über einen bestimmten Zeitraum nochmals gemittelt. Dieser Zeitraum wurde von 0,5 Sek. bis 1,5 Sek. gewählt, um ein anfängliches „Einpendeln“ der Lösung nicht in die Berechnung mit einzubeziehen. Diese Mittelwerte sind in den Tabellen 4.2.2, 4.2.3 und 4.2.4 dargestellt und mit der Überschrift „Mittelwerte*“ gekennzeichnet.

Durch das zeitliche Mitteln der Werte ist es unmöglich, Stress-Spitzen an bestimmten Stellen im Vial während eines bestimmten Zeitpunktes der Bewegung noch zu erkennen. Aus diesem Grund wurde der höchste Wert, also das Maximum, innerhalb des Vials zu jedem Zeitpunkt ausgelesen. Diese Maxima zu den einzelnen Zeitpunkten wurden dann über dieselbe Zeitspanne (0,5 - 1,5 Sek.) gemittelt, um auch hier ein Ranking vornehmen zu können, beispielsweise von verschiedenen Füllmengen. Auch diese Werte sind in Tab. 4.2.2, 4.2.3 und 4.2.4 im Vergleich zu den Schüttelintensitäten aufgeführt und mit der Überschrift „Max-Werte“ gekennzeichnet.

Die dritte Auswertung, die vorgenommen wurde, waren die Änderungen der Mittelwerte. In Abb. 4.2.3D können, z.B für den Druck, für die unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten

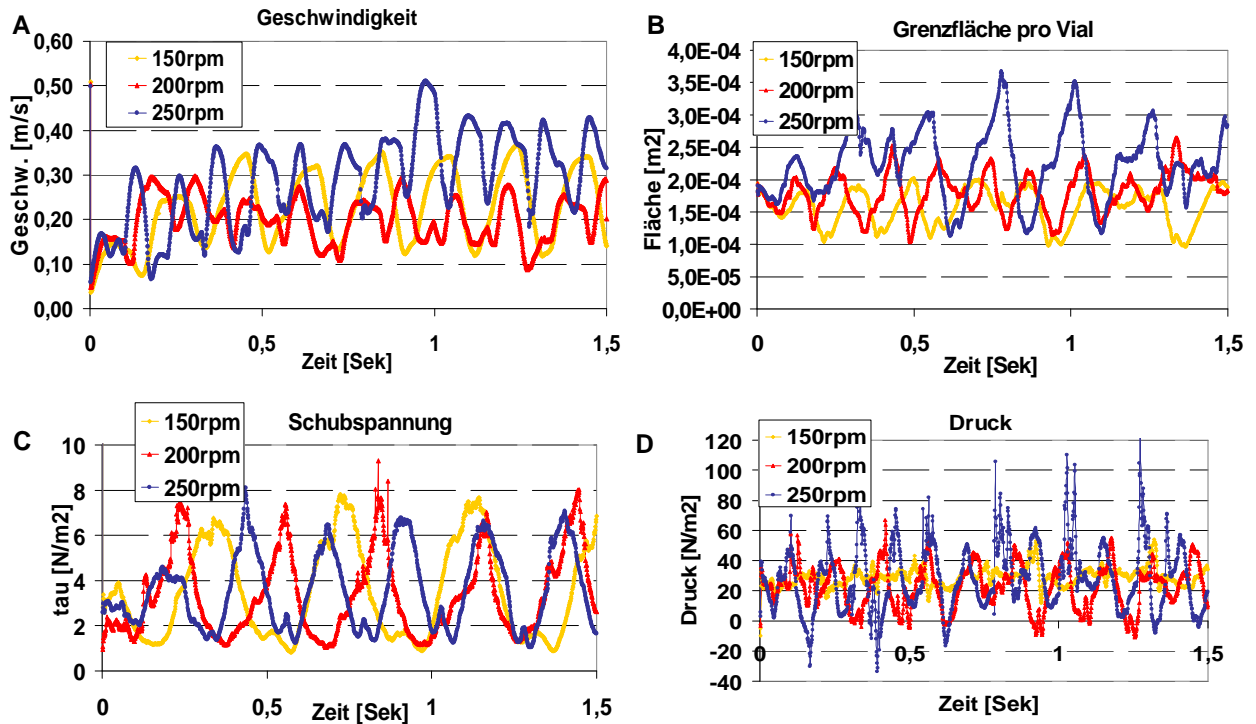


Abbildung 4.2.3 Mittelwerte von A: Geschwindigkeiten; B: Grenzfläche zur Luft; C: Schubspannung/Scherung; D: Druck über 1,5 Sekunden für PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung mit 1 ml Füllmenge bei 150, 200 und 250 U/min

unterschiedliche Ausschläge der Kurven (Amplituden) beobachtet werden. Gemittelt über eine Zeitspanne wird kaum ein Unterschied zwischen den Schüttelintensitäten detektiert (Tab. 4.2.2), denn die Amplituden sind gemittelt nicht mehr sichtbar. Berechnet man allerdings die Änderungen der Werte über die Zeit (indem man den 1. Wert vom 2. abzieht, den 2. vom 3. usw. und jeweils den Betrag davon berechnet), dann kann für 250 U/min ein erheblicher Unterschied zu den anderen beiden Schüttelintensitäten gesehen werden (Tab. 4.2.2). Aus diesem Grund sind ebenfalls die Änderungen der Werte, die die Amplituden widerspiegeln, in den Tabellen aufgeführt und mit dem Wort „Änderung“ gekennzeichnet.

4.2.1.2 Simulation von verschiedenen Schüttelintensitäten

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Simulationen von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml (über eingegebene Stoffgrößen simuliert) mit 1 ml Füllmenge bei drei verschiedenen Schüttelintensitäten besprochen. In Tab 4.2.2 sind die oben vorgestellten Auswertungen gemittelt über den Zeitraum 0,5-1,5 Sek. für die Ergebnisgrößen Geschwindigkeit, Druck, Scherkraft und Grenzfläche zur Luft dargestellt. Vergleichend mit den Laborergebnissen aus Kapitel 4.1.2 sollten mit Hilfe der Simulation die Einflussgrößen, die während des Schüttelns innerhalb des Vials auftreten und verantwortlich für die

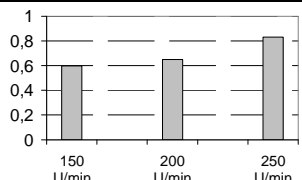
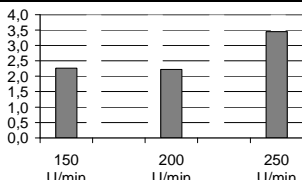
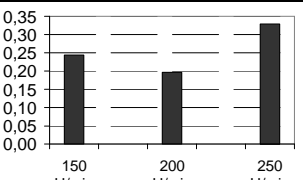
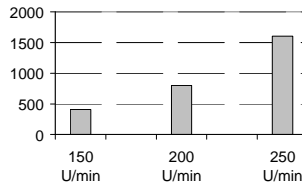
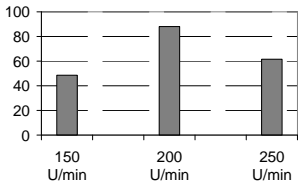
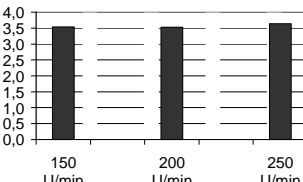
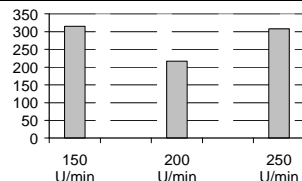
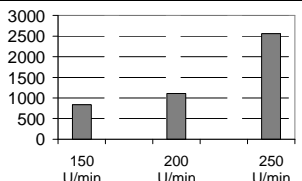
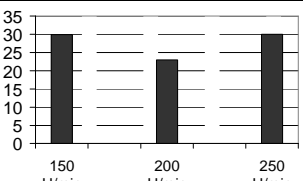
Instabilitäten sind, identifiziert werden. In den Laborergebnissen konnten zunehmende Instabilitäten mit zunehmenden Schüttelintensitäten beobachtet werden. Wie oben schon angesprochen, werden in der Literatur vorzugsweise Grenzflächenstress und Scherstress als mögliche Ursachen diskutiert [Harrison et al. 1998; Patapoff und Esue 2009]. Tabelle 4.2.2 ist zu entnehmen, dass die Mittelwerte der Grenzflächen mit zunehmender Schüttelintensität zunehmen. Die Mittelwerte der Scherkräfte zeigen allerdings für alle drei Schüttelintensitäten annähernd dieselben Werte. Jedoch nehmen die Scherspitzen mit zunehmender Schüttelintensität zu. Das könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise nicht die Scherkraft im Mittel ansteigen, sondern eine Art „Schwelle“ der Scherkraft überwunden werden muss, um Instabilitäten zu verursachen. Oder, wie auch in der Literatur diskutiert, die Scherung hat alleine keinen bzw. kaum einen Einfluss [Maa und Hsu 1997], sondern viel wichtiger ist die Grenzfläche zur Luft [Bee et al. 2009b]. Da die Grenzflächen mit zunehmender Schüttelintensität zunehmen, wäre dies eine Erklärung für die in den Laborversuchen beobachteten zunehmenden Instabilitäten des Cetuximabs.

Wie häufig sich die Grenzfläche erneuert und sich die Geschwindigkeiten innerhalb der Lösung ändern, könnten weitere Aspekte sein, die Aufschluss über die Stressursache ergeben. Denn je höher diese Werte sind, desto besser durchmischt ist die Lösung. Wenn die Lösung gut durchmischt ist, kommen immer neue Antikörper an die Luft-Wasser-Grenzfläche oder treffen auf andere in der Lösung vorhandene Antikörper, so dass eine Aggregation schneller stattfinden kann. Die hier berechneten Geschwindigkeiten betrachtend, nehmen die maximalen Werte (gemittelt) mit zunehmender Schüttelintensität zu (Tab. 4.2.2). Die Mittelwerte der Geschwindigkeiten hingegen zeigen im Vergleich der Schüttelintensitäten für 200 U/min die geringste Geschwindigkeit, was auch aus Abb. 4.2.3 A hervorgeht. Mit höheren Schüttelintensitäten wäre eigentlich auch im Mittel eine höhere Geschwindigkeit erwartet worden, was aber in diesem Fall nicht zu erkennen war.

Ähnliches gilt für den Druck. Auch hier schneidet 200 U/min mit recht geringen Werten ab. Sogar die Maximalwerte zeigen hier für 200 U/min den geringsten Mittelwert. Allerdings scheinen die großen Amplituden der 250 U/min im Mittel ein irreführendes Ergebnis zu zeigen, erst die Betrachtung der Änderungen ergibt das zu erwartende Ergebnis, nämlich dass mit höheren Schüttelintensitäten die Drücke stärker schwanken (Abb. 4.2.3 D).

Betrachtet man die Abb. 4.2.3, ist zu erkennen, dass die Werte für 250 U/min meist die größten Amplituden aufweisen. Bei dieser schnellen Schüttelgeschwindigkeit ändern sich die Drücke wie auch die Grenzflächen sehr viel stärker als bei 200 U/min und 150 U/min.

Tabelle 4.2.2 Ergebnis der Simulation von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (5 mg/ml) gefüllt mit 1 ml Füllmenge und geschüttelt mit verschiedenen Schüttelintensitäten (Mittelwerte von 0,5 -1,5 Sek.)

	Max-Werte	Änderung	Mittelwert*
Geschwindigkeit [m/s]			
Scherkraft [N/m ²]			
Grenzfläche [m ²]	Nur eine Grenzfläche pro Zeitpunkt, deshalb kein Maximum ermittelbar		
Druck [N/m ²]			

Die beiden langsamen Schüttelgeschwindigkeiten zeigen im Vergleich dazu einheitlichere Werte. Die Schubspannung, also Scherung, zeigt für alle drei Schüttelintensitäten annähernd dieselben Ergebnisse, mit dem Unterschied einer Phasenverschiebung. Diese Verschiebung kommt, wie auch bei den anderen Ergebnisgrößen, dadurch zustande, dass bei gleicher Zeit bei einer schnelleren Schüttelgeschwindigkeit häufiger der Wendepunkt der rechts-/links-Bewegung erreicht wird. Interessant ist hierbei, dass sich trotz höherer Geschwindigkeit bei schnelleren Schüttelintensitäten keine höheren Schubspannungen ergeben, sie nur häufiger innerhalb eines Zeitintervalls auftreten, als bei geringeren Schüttelintensitäten. Falls also die Schubspannung für die Instabilitäten verantwortlich wäre, würden nicht höhere Werte, die mit höheren Belastungen für die Proteine gleichgesetzt werden könnten, die Proteine destabilisieren, sondern die Einwirkzeit.

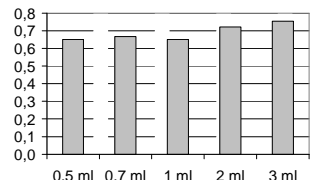
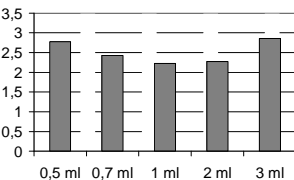
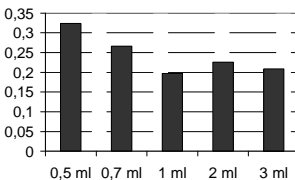
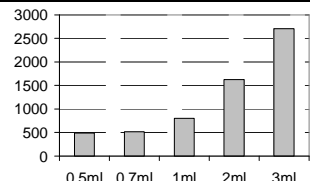
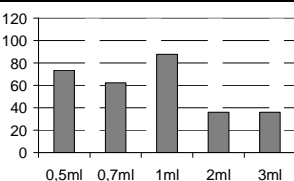
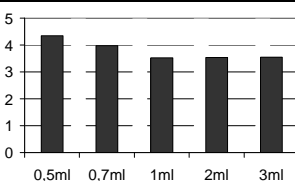
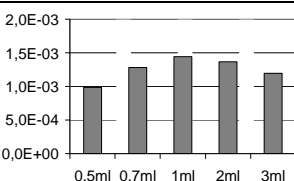
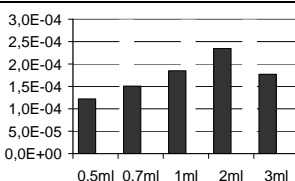
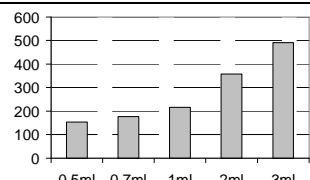
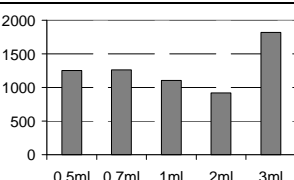
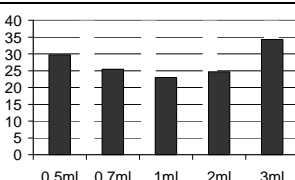
Es ist fraglich, welche Aussagekraft gemittelte Werte für eine Auswertung von Simulationen überhaupt haben. Um aber überhaupt einen Vergleich zu den Laborergebnissen ziehen zu können, ist ein Ranking der Schüttelparameter, wie es oben vorgenommen wurde, unumgänglich.

4.2.1.3 Simulation von verschiedenen Füllmengen

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Füllmengen-Versuche anhand von Simulationen der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml geschüttelt mit 200 U/min mit fünf verschiedenen Füllmengen erläutert werden. Tab. 4.2.3 zeigt die Zusammenfassung der Mittelwerte von 0,5-1,5 Sekunden Schüttelzeit. In den Laborversuchen konnten bei 200 U/min die stärksten Instabilitäten bei 1 ml Füllmenge ausgemacht werden. Abnehmend zu höheren wie zu geringeren Füllmengen reduzierten sich die Instabilitäten, also folglich auch der Stress. Dasselbe Ranking wurde auch in den berechneten Werten der Simulation gesucht.

Es konnte allerdings keine Ergebnisgröße genau dasselbe Ranking wie in den Laborversuchen hervorbringen, abgesehen von der Änderung der Grenzfläche (Tab. 4.2.3). Dies würde bedeuten, dass die Erneuerung der Grenzfläche das ausschlaggebende Kriterium für eine Protein-Aggregation beim Schütteln ist. Dieses Ergebnis passt allerdings nicht mit dem oben besprochenen Vergleich der Schüttelintensitäten überein, denn dort zeigte die Änderung der Grenzfläche keine Korrelation mit den Ergebnissen der Laborversuche.

Tabelle 4.2.3 Ergebnis der Simulation von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (5 mg/ml) mit 200 U/min geschüttelt im 2 ml-Vial mit verschiedenen Füllmengen (Mittelwerte von 0,5-1,5 Sek.)

	Max-Werte	Änderung	Mittelwert*
Geschwindigkeit [m/s]			
Scherkraft [N/m ²]			
Grenzfläche [m ²]	Nur eine Grenzfläche pro Zeitpunkt, deshalb kein Maximum ermittelbar		
Druck [N/m ²]			

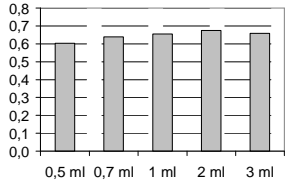
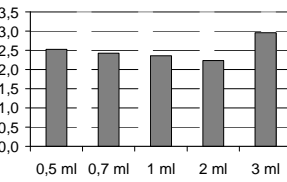
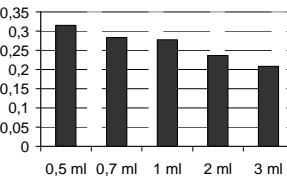
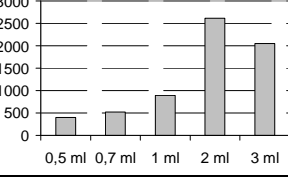
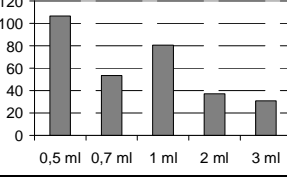
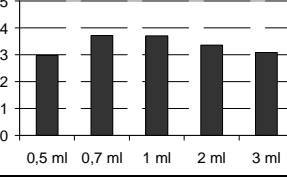
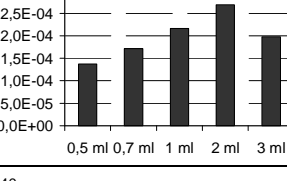
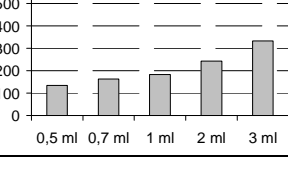
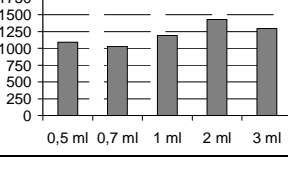
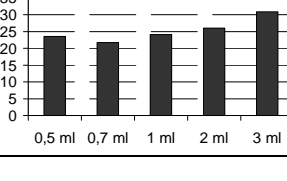
Die Mittelwerte der Grenzflächen zeigten zwar den höchsten Wert nicht in der Füllmenge von 1 ml, sondern in der Füllmenge von 2 ml. Aber es sieht so aus, wie auch schon im Vergleich der Schüttelintensitäten, als ob die LWG einen Einfluss auf das Ergebnis hat, denn der „Dacheffekt“ war wie in den Laborversuchen, auch wenn er zu den 2 ml Füllmenge verschoben wurde, zu sehen. Die anderen Ergebnisgrößen ergaben keine Übereinstimmungen mit den Ergebnissen aus den Laborversuchen. Die Scherkräfte zeigten, die Mittelwerte betrachtend, für alle Füllmengen ähnliche Werte. Und aus den Druck- sowie Geschwindigkeitswerten ließ sich in diesem Fall ebenfalls wenig herauslesen.

Um der Vollständigkeit halber noch auf die unterschiedlichen Formulierungen bzw. in diesem Fall die Formulierung mit und ohne Tween einzugehen, werden in Tab. 4.2.4 noch die Füllmengen-Versuche der Cetuximab-Marktformulierung vorgestellt. Zwar lässt sich die Formulierung selbst nicht simulieren, jedoch bewegt sich die Flüssigkeit anders, wenn Stoffgrößen wie Viskosität, Dichte etc. verändert sind. Daher konnte durch Eingabe der entsprechenden Stoffgrößen zum einen die Marktformulierung (0,01% Tween 80 enthaltend) und zum anderen die PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung (5 mg/ml) simuliert werden. Vergleicht man Tab. 4.2.4 (Marktformulierung) mit den Werten von Tab. 4.2.3 (Cetuximab in PBS), so können gewisse Unterschiede im Ranking der Füllmengen für verschiedene Ergebnisgrößen erkannt werden. Die Scherkraft z. B. zeigte in den Mittelwerten für 0,5 ml Füllmenge in der PBS-gepufferten Lösung den größten Wert, in der Simulation der Marktformulierung zeigt 0,7 bzw. 1 ml den größten Wert. Auch die Druckmaxima sind für die Marktformulierung bei einer Füllmenge von 3 ml nur noch bei ca. 330 N/m^2 , während sie bei der PBS-gepufferten Lösung bei ca. 500 N/m^2 lagen. Diese Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Formulierungen auf Grund ihrer Stoffgrößen auch ein unterschiedliches Strömungsverhalten verursachen und somit schwer zu vergleichen sind, da unterschiedliche Kräfte auf die Lösung wirken.

Die Mittelwerte der Grenzfläche blieben allerdings für beide Formulierungen im Ranking gleich, auch wenn die Absolutwerte sich leicht unterschieden. Wenn also die Grenzfläche der ausschlaggebende Faktor für die beobachtete Aggregation sein sollte, scheint die Formulierung einen geringeren Einfluss auf den Stress zu haben als die Füllmenge.

Die Änderung der Grenzfläche über die Zeit zeigte für die Marktformulierung den höchsten Wert in der 2 ml-Füllmengen-Simulation, für die PBS-gepufferte Lösung in der 1 ml-Simulation. Auch in den Laborversuchen konnten die stärksten Instabilitäten der beiden Lösungen jeweils bei diesen beiden Füllmengen gesehen werden. Die PBS-gepufferte Lösung

Tabelle 4.2.4 Ergebnis der Simulation von Cetuximab-Marktformulierung mit 200 U/min geschüttelt im 2 ml-Vial mit verschiedenen Füllmengen (Mittelwerte von 0,5-1,5 Sek.)

	Max-Werte	Änderung	Mittelwert*
Geschwindigkeit [m/s]			
Scherkraft [N/m ²]			
Grenzfläche [m ²]	Nur eine Grenzfläche pro Zeitpunkt, deshalb kein Maximum ermittelbar		
Druck [N/m ²]			

wies in der 1 ml-Probe die stärksten Instabilitäten und die Marktformulierung, welche eigentlich stabil geblieben war, zeigte nur in der 2 ml-Probe im Gegensatz zu allen anderen Füllmengen einen leichten Anstieg an löslichen Aggregaten (siehe Anhang A4, Tab. A.4). Vielleicht ist es Zufall, dass diese Füllmenge in der Simulation auch den höchsten Wert in der Grenzflächen-Änderung zeigte, oder die Erneuerung der Grenzfläche zur Luft hat doch einen Einfluss auf die Aggregatbildung.

4.2.1.4 Vergleich der Simulation mit der Realität anhand von Hochgeschwindigkeitsbildern

In der Strömungslehre werden numerisch berechnete CFD-Simulationen meist experimentell überprüft. Für den hier gezeigten Fall eines bewegten Zweiphasensystems gibt es das Modell des „sloshing tanks“, welches schon häufig in der Literatur beschrieben wurde [Rebouillat und Liksonov 2010]. Um die Richtigkeit numerischer Modelle experimentell zu überprüfen, können beispielsweise Gefäße während des Schüttelvorgangs mit Drucksensoren versehen werden [Panigrahy et al. 2009]. Die während des Schüttelns gemessenen Drücke werden mit jenen der numerischen Simulation verglichen. Oder es kann über das VOF-Verfahren [Eswaran et al. 2009] die Bewegung der Flüssigkeit in der Simulation erfasst und danach mit Videoaufnahmen (mittels Hochgeschwindigkeitskamera) der realen Gefäße während des

Schüttelvorgangs verglichen werden. Letzteres wurde auch in der vorliegenden Arbeit gemacht und soll im Folgenden besprochen werden.

Wenn man Abb. 4.2.4 betrachtet, welche die Realaufnahmen des Schüttelvorgangs mit denen der CFD-Simulationen zu denselben Zeitpunkten vergleicht, fällt ein deutlicher Unterschied zwischen Realität und Simulation auf. Die Simulation zeigte Fehler in der Vial-Mitte (Abb. 4.2.4, 4.2.6 rote Pfeile, bei 3 ml Füllung auch horizontaler Strich zu erkennen) und keine gute Benetzung der Vial-Innenfläche und erzeugte dadurch ein verändertes Strömungsverhalten. Die Glaswand wurde dem Programm als Begrenzungs-Wand vorgegeben, aber anscheinend konnte das Programm die Benetzung ausgehend von den vorgegebenen Stoffgrößen nicht richtig berechnen. Vor allem bei gering befüllten Vials (Füllmengen 0,5 ml bis 1 ml) sind große Unterschiede zu den Hochgeschwindigkeitsbildern festzustellen (Abb. 4.2.5; Abb. 4.2.6). Die Simulation der Vials mit den größeren Füllmengen scheinen der Realität näher zu kommen, da hier die Benetzung der Glaswand aufgrund der hohen Füllmenge keine so große Rolle spielt. Ein weiterer Fehler der Simulation scheinen die mittleren Zellen des Gitters innerhalb des Vials zu sein. An dieser Stelle des Vials waren die Unterteilungen des generierten Gitters am kleinsten und anscheinend hatte dies Auswirkung auf die Simulation. Dort konnte häufig ein flacher Bereich ohne Flüssigkeit erkannt werden (siehe Abb. 4.2.4 viertes Bild von links). In den Bildern, die die Scherkräfte-, Druck- und Geschwindigkeitsverteilung anzeigen (siehe Anhang A3, Abb. A.3.1, A.3.2, A.3.3), konnten hier ebenfalls überhöhte Werte ermittelt werden.

In Abb. 4.2.5 ist für die Füllmengen 0,5, 0,7, 1, 2 und 3 ml jeweils eine komplette rechts-/links-Bewegung in Form von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen dargestellt. Falls die Grenzfläche zur Luft der ausschlaggebende Faktor für die Aggregation ist, sollte hier die Füllmenge mit 1 ml die größte Grenzfläche zeigen. Dies wird durch die Hochgeschwindigkeitsaufnahmen zumindest qualitativ bestätigt.

Eine Füllung der Vials mit 0,5 oder 0,7 ml zeigte in den Hochgeschwindigkeitsbildern keine komplette Benetzung der Glaswand mehr. Der obere mittlere Teil der Glaswand wurde bei der „Schwappbewegung“ nicht erreicht und benetzt (Abb. 4.2.5). Im Gegensatz dazu zeigte die Füllmenge mit 1 ml eine komplette Benetzung der Glaswand während des Schüttelvorgangs, woraus eine sehr große Luft-Wasser-Grenzfläche resultierte. War das Vial mit 2 ml gefüllt, zeigte es ebenfalls eine komplette Benetzung. Aber durch die erhöhte Füllmenge war die Grenzfläche zur Luft geringer. Bei einer Füllmenge von 3 ml befand sich nur noch eine Luftblase innerhalb des Vials, die sich von rechts nach links bewegte.

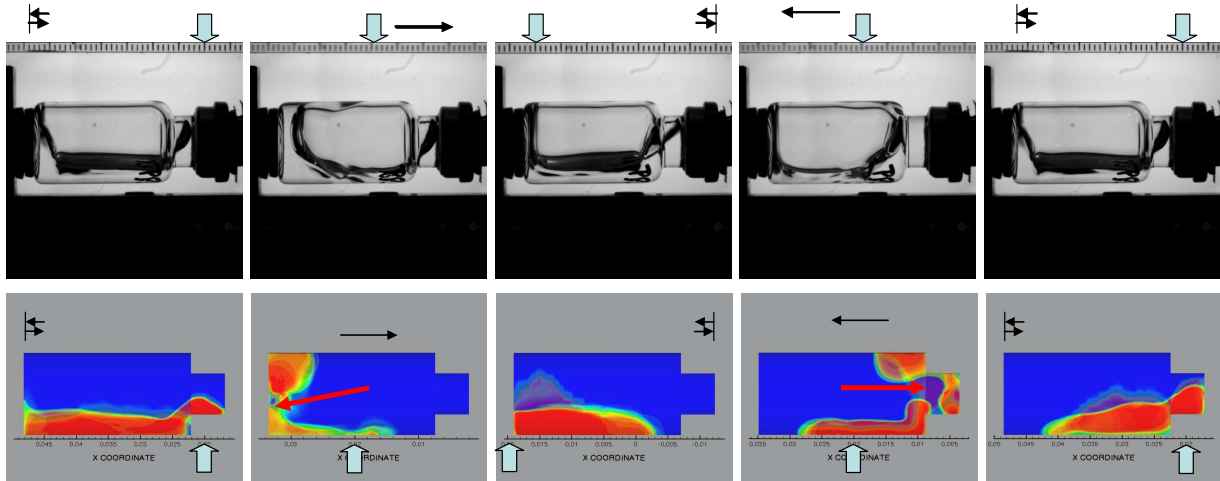


Abbildung 4.2.4 Vergleich von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen (oben) mit Simulationsaufnahmen (unten; blau = Luft; rot = Lösung) von einem Schüttelvorgang (links-rechts-links) von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 1 ml Füllmenge, geschüttelt bei 200 U/min; helle Pfeile zeigen feste Markierung auf dem Schüttler; schwarze Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung des Vials in der rechts-/links-Bewegung an; rote Pfeile zeigen Beispiele fehlerhafter Simulationsbereiche in den mittleren Zellen; Bilder von links: erstes Bild jeweils Linksanschlag; zweites Bild jeweils Mitte zwischen Links- und Rechtsanschlag; drittes Bild jeweils Rechtsanschlag; viertes Bild jeweils Mitte zwischen Rechts- und Linksanschlag; fünftes Bild jeweils wieder Linksanschlag.

Hier schien die Luft-Wasser-Grenzfläche genauso klein wie in dem Vial mit 0,5 ml-Füllung zu sein.

Aus der Betrachtung der Hochgeschwindigkeitsbilder lässt sich also die Schlussfolgerung ziehen, dass im Vergleich zu den anderen untersuchten Füllmengen eine Befüllung mit 1 ml die Bildung der größten Grenzfläche zur Luft nach sich zieht.

Dies könnte der Hintergrund für die in Kapitel 4.1.2 gezeigten Ergebnisse des Füllmengenversuches sein. Die Abnahme der Instabilitäten, sowohl zu geringeren wie auch zu höheren Füllmengen hin, kann mit dieser Theorie allerdings nicht vollständig erklärt werden. Die 0,5 ml-Füllung erzeugte zwar absolut betrachtet annähernd dieselbe Grenzfläche wie die 3 ml-Füllung, aber die Ergebnisse unter 4.1.2 wurden pro Volumen ausgewertet und pro Milliliter berechnet ergab sich für die 0,5 ml-Füllung eine größere Luft-Wasser-Grenzfläche als für die 3 ml-Füllung. Die Ursache für die dennoch recht ähnlichen quantitativen Instabilitäten aus 4.1.2 könnte die Erneuerung der Grenzfläche in Kombination mit der Größe der Grenzfläche gewesen sein.

Durch die gute Benetzbarkeit des Vials wird bei einer Füllmenge von 0,5 ml die Flüssigkeit kaum bewegt und die Grenzfläche nicht so schnell erneuert, im Gegensatz zu einem besseren Durchmischen innerhalb größerer Füllmengen. Folglich hätten prozentual betrachtet genauso viele Proteine in den Vials mit größeren Füllmengen Kontakt zur Luft-Wasser-Grenzfläche wie in den gering gefüllten Vials.

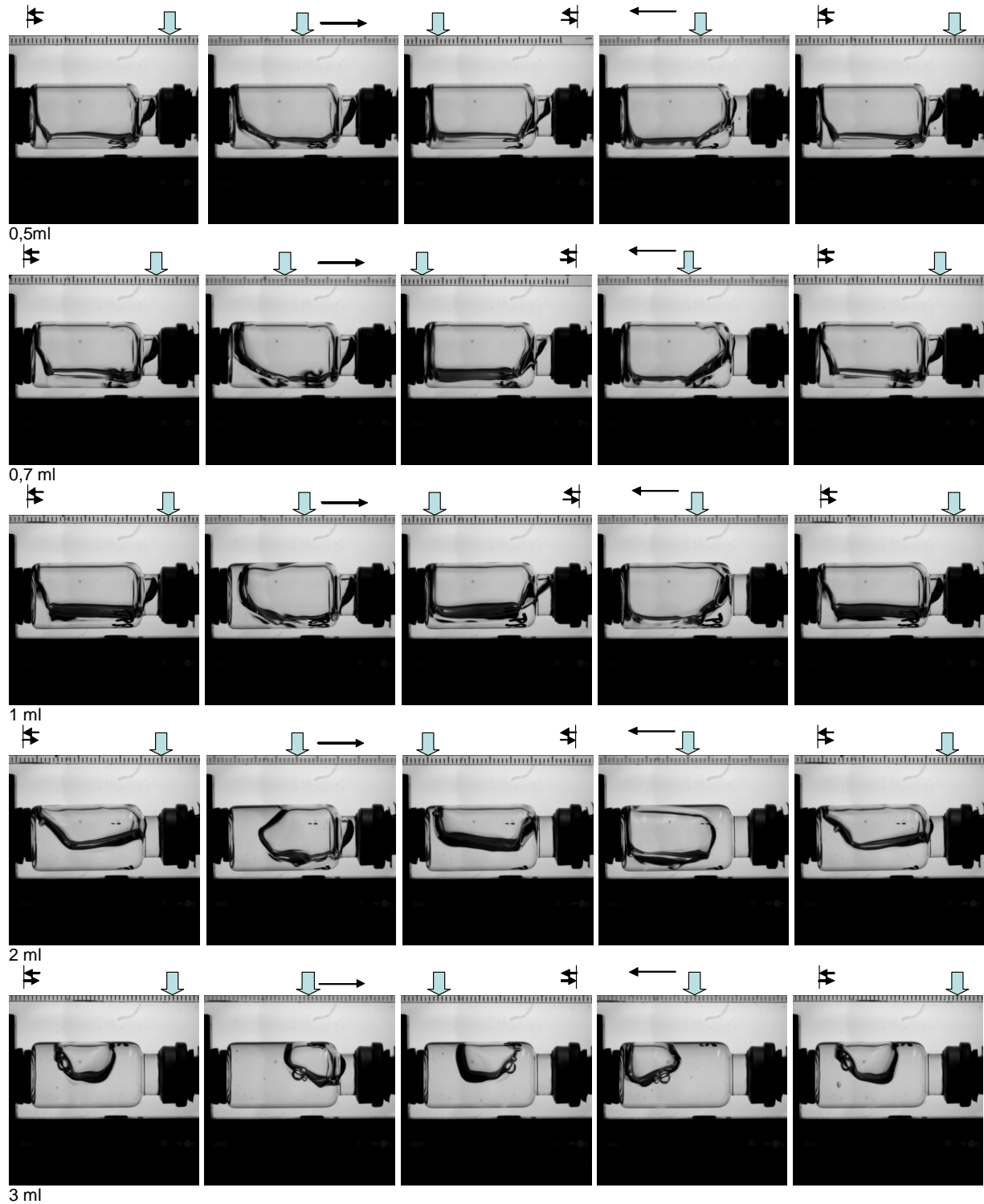


Abbildung 4.2.5 Hochgeschwindigkeitsaufnahmen von einem Schüttelvorgang (links-rechts-links) von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit verschiedenen Füllmengen, geschüttelt bei 200 U/min; helle Pfeile zeigen feste Markierung auf dem Schüttler; schwarze Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung des Vials in der rechts-/links-Bewegung. Bilder von links: erstes Bild jeweils Linksanschlag; zweites Bild jeweils Mitte zwischen Links- und Rechtsanschlag; drittes Bild jeweils Rechtsanschlag; viertes Bild jeweils Mitte zwischen Rechts- und Linksanschlag; fünftes Bild jeweils wieder Linksanschlag

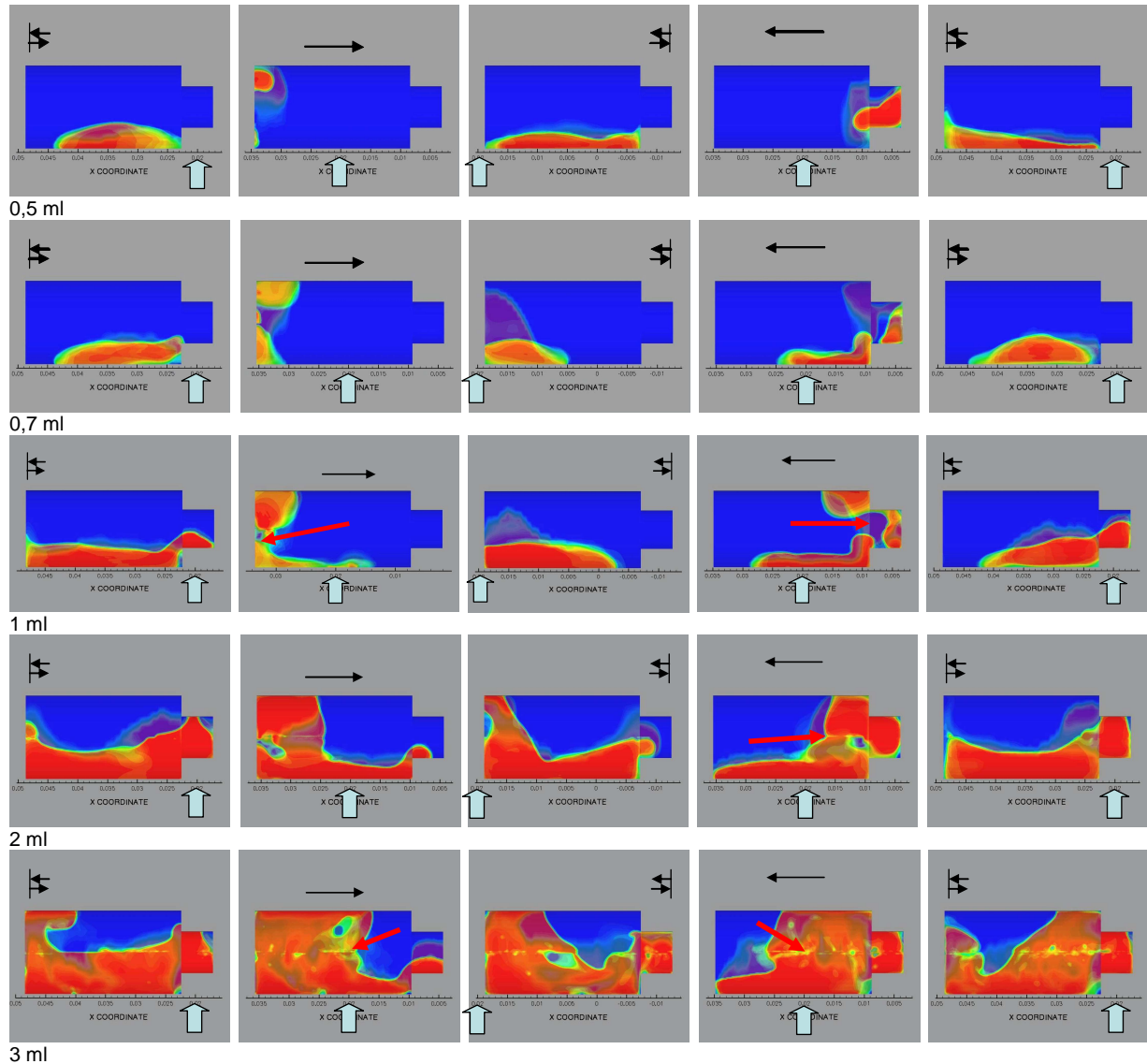


Abbildung 4.2.6 CFD-Simulationsdarstellungen (VOF; blau = Luft; rot = Lösung) von einem Schüttelvorgang (links-rechts-links) von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit verschiedenen Füllmengen, geschüttelt bei 200 U/min; helle Pfeile zeigen feste Markierung auf dem Schüttler; schwarze Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung des Vials in der rechts-/links-Bewegung an; rote Pfeile zeigen Beispiele fehlerhafter Simulationsbereiche in den mittleren Zellen. Bilder von links: erstes Bild jeweils Linksanschlag; zweites Bild jeweils Mitte zwischen Links- und Rechtsanschlag; drittes Bild jeweils Rechtsanschlag; viertes Bild jeweils Mitte zwischen Rechts- und Linksanschlag; fünftes Bild jeweils wieder Linksanschlag

Auch in der Simulation konnte die Änderung der Grenzfläche zumindest für den Füllmengenversuch ähnliche Ergebnisse wie in den Laborversuchen zeigen.

Betrachtet man sich allerdings die Simualtionsbilder, kann man erkennen, dass die Größe der Grenzfläche zur Luft aufgrund der fehlerhaft berechneten Benetzung der Glaswand eine andere ist. Wahrscheinlich ist auch die Durchmischung eine andere, da sich durch das schlechte Benetzen der Wand die Lösung in der Simulation stärker bewegt. Aus diesem

Grund ist es fraglich, ob die oben diskutierten Ergebnisse der Simulation im Ranking für die Füllmengen oder Schüttelintensitäten überhaupt eine Aussagekraft haben.

4.2.1.5 Zusammenfassende Diskussion

Die Ursache für physikalischen Stress, wie er beim Schütteln auftritt, genau zu differenzieren, erscheint bisher als sehr schwierig. Experimentell kann Scherstress von Grenzflächenstress nur schwer bzw. nicht richtig getrennt werden, mit Hilfe einer CFD-Simulation sollte dies jedoch möglich sein. Sobald in experimentellen Versuchen Scherung in der Lösung stattfindet, ist auch eine Grenzfläche vorhanden, und sei es nur die Glaswand des Gefäßes. Die Größe der Luft-Wasser-Grenzflächen kann während des Schüttelns mittels der Mathematik in einer Simulation genau berechnet werden. Experimentell ist dies ebenfalls schwer möglich.

Die hier gezeigten Berechnungen der CFD-Simulation sollten allerdings unter Vorbehalt begutachtet werden, denn in der zur Verfügung stehenden Zeit konnte keine korrekte CFD-Simulation generiert werden. Da Fehler in den mittleren Zellen des Gitters auftauchten und die Benetzung der Glaswand nicht wahrheitsgemäß wiedergegeben werden konnte, was der Vergleich von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen mit den Simulationsaufnahmen zeigte, sind die erhaltenen Ergebnisse nur eine Diskussionsgrundlage und kein Beweis.

Die Simulation zeigte im Ranking für die Füllmengen und die Schüttelgeschwindigkeiten, dass die Berechnung der Luft-Wasser-Grenzfläche (LWG) besser mit den Laborergebnissen übereinstimmte als die Berechnung der Scherkraft. Auch die Änderung der Grenzflächengröße zeigte in der Füllmengen-Simulation sowohl für die Marktformulierung wie für die PBS-gepufferte Lösung ein gleiches Ranking der Füllmengen wie in den Laborversuchen.

Die Hochgeschwindigkeitsaufnahmen konnten die Hypothese der LWG als Ursache für Aggregation bestätigen, denn im Füllmengenvergleich zeigte auch hier die 1 ml-Füllung die größte LWG, da das komplette Vial benetzt wurde. Die Füllmengen 0,5 und 3 ml zeigten die kleinsten LWGs. Allerdings sollte die LWG pro Volumen betrachtet werden. Hier würde bei gleicher LWG 0,5 ml einen wesentlich größeren Wert als 3 ml erhalten. Deshalb lassen diese, oben schon diskutierten Ergebnisse auf eine Kombination von LWG und Durchmischung der Flüssigkeit als Ursache für die entstandenen Instabilitäten schließen. Auch die Betrachtung der Hochgeschwindigkeitsbilder bei verschiedenen Schüttelintensitäten kann diese Hypothese untermauern (Tab. A.3.1, Anhang A3). Die größeren Instabilitäten in den Laborergebnissen bei z.B. 250 U/min im Vergleich zu 150 U/min (Kapitel 4.1.2) können damit erklärt werden,

dass bei einer höheren Schüttelintensität auch die LWG und die Durchmischung der Flüssigkeit steigt.

Eine weitere interessante Beobachtung waren die unterschiedlichen Ergebnisse, die im Vergleich von Marktformulierung und PBS-gepufferter Lösung in der Simulation generiert werden konnten. Da sich diese beiden Lösungen in der Simulation nur durch ihre Stoffgrößen unterschieden, kann hieraus abgelesen werden, dass anscheinend ein anderes Strömungsverhalten resultierte. Dieses andere Strömungsverhalten kann andere Ergebnisse hinsichtlich Scherung oder LWG verursachen.

Auch wenn die Simulation fehlerhaft war, sollte trotzdem dieser Erklärungsansatz nicht unbesprochen bleiben. CFD-Simulationen beruhen auf sehr komplexen Berechnungen. Bisher gibt es keine Veröffentlichungen hinsichtlich des hier untersuchten Themas. In der Literatur wird das Modell des „Sloshing tank“ beschrieben. Dieses wurde bisher am häufigsten bei Problemstellungen in der Seefahrt angewandt [Aliabadi et al. 2003; Popov et al. 1992]. Zum Beispiel wurde der Nutzen von Wellenbrechern an „sloshing tank“ Modellen untersucht [Liu und Lin 2009]. Oder das Verhalten von Flüssigkeiten in großen Tanks, dessen Formen variiert wurden, um Druckspitzen zu minimieren, wurde daran getestet [Shekari et al. 2009; Virella et al. 2006]. Auch hier wurden Vergleiche zu experimentellen Daten gezogen, um die Richtigkeit der Simulation zu überprüfen [Rebouillat und Liksonov 2010]. An diesen Literaturstellen kann man erkennen, wie wichtig die Formen und Größen der zu simulierenden Gefäße sind und wie unterschiedlich die resultierenden Strömungen sein können (vgl. Kapitel 4.1.2). Da in der hier durchgeführten Simulation nur eine vereinfachte Form des Original-Vials verwendet wurde, könnte auch das der ausschlaggebende Fehler für die nicht korrekte Simulation gewesen sein. Weitere Fehler der Simulation sind wahrscheinlich auch die Benetzung der Glaswand, die in der Simulation fehlerhaft dargestellt wurde, ebenso wie die berechnete laminare Strömung. Es ist nämlich nicht auszuschließen, dass hier auch eine turbulente Strömung vorkommen kann. Turbulente Strömungen zu berechnen, stellt allerdings eine noch umfangreichere Aufgabenstellung dar und war in der vorgegebenen Forschungszeit nicht durchführbar.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich durch eine Weiterentwicklung der CFD-Simulation und Ausräumung der Fehler in zukünftigen Studien möglicherweise die Kräfte berechnen lassen, die während des Schüttelns auftreten und für die Instabilitäten verantwortlich sind.

4.2.2 Erklärungsversuch der Schüttelstressergebnisse anhand zweier Stressmethoden: Scherstress und Luft-Wasser-Grenzflächenstress

4.2.2.1 Vergleich von Scherstress mit Luft-Wasser-Grenzflächenstress

Die in der Literatur bisher diskutierten Ursachen wie Luft-Wasser-Grenzfläche (LWG) und Scherung [Maa und Hsu 1996; Oliva et al. 2003; Serno et al. 2010] wurden in diesem Versuch als Stressmethode nachempfunden. Der Scherstress wurde mittels Rühren in einem 6 ml-Vial ohne Luft (Abb. 4.2.7 A) erzeugt, die Luft-Wasser-Grenzfläche mittels Begasen mit Luft in einem 50 ml-Vial (Abb. 4.2.7 B). Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen des Schüttelversuches (4.1.2) verglichen, um z.B. über Form oder Größe der Aggregate Rückschlüsse auf einen der beiden Stresseinflüsse zu ziehen. Dieser Versuch stellt nur einen Ansatz zur Ursachenforschung der Aggregatbildung während des Schüttelns dar.

Es wurde dieselbe PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung (5 mg/ml, pH 7,2) wie in dem Schüttelversuch in Kapitel 4.1.2 gewählt, um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Um auch den Einfluss von Tween 80 auf die beiden Stressmethoden zu untersuchen, wurde ein Teil der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung mit 0,01 % Tween 80 versetzt. Diese Ergebnisse sollen aber erst unter 4.2.2.2 besprochen werden. Als analytische Methoden wurden neben visueller Kontrolle, Mikroskopie, Trübung und SEC auch PAMAS-Messungen durchgeführt. Zunächst sollen die Instabilitäten, die durch die verschiedenen Stressmethoden erzeugt wurden, aufgeführt und diskutiert werden.

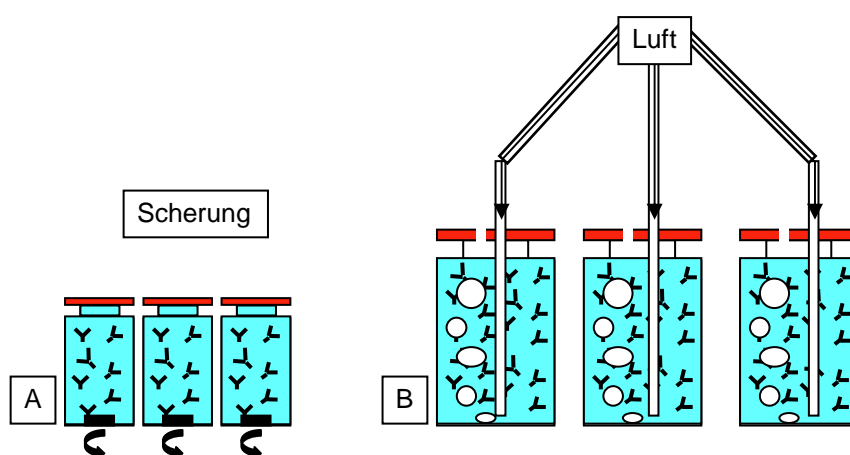


Abbildung 4.2.7 Schematische Darstellung des (A) Scherstress und des (B) Luft-Wasser-Grenzflächen-Stresses (LWG-Stress) der Cetuximab-Lösung

Die Proben wurden nach verschiedenen Zeiten (0, 5, 24, 48 h für alle drei Stressarten, 72 h für Rühr- und Begasungs- und 120 h für Schüttelstressversuche) entnommen und für die visuelle Kontrolle in 6 ml-Vials umgefüllt (abgesehen von den Rührversuchen, die auch in 6 ml-Vials durchgeführt wurden). Sie zeigten sowohl bei dem Rührversuch wie auch bei dem Begasungs-Versuch eine zunehmende Trübung mit zunehmender Stresszeit (Abb. 4.2.8). Die auftretenden Trübungen unterschieden sich allerdings erheblich. Während der Rührstress eine milchige Lösung hervorrief, konnte nach dem Begasungsstress eine flockige Lösung beobachtet werden. Die entstandenen Aggregate bei dem letzteren Versuch waren wesentlich größer und die Lösung wirkte insgesamt weniger trüb. Die Lösungen mit Tween 80, die in Abb. 4.2.8 ebenfalls dargestellt sind, werden im weiteren Verlauf dieses Kapitels noch begutachtet und diskutiert.

Unter dem Mikroskop konnte das Erscheinungsbild begutachtet werden (Abb. 4.2.9). Der Begasungsstress erzeugte große Proteinaggregate, die sich „kugelförmig“ zu Präzipitaten zusammen lagerten. Die Lösungen hingegen, welche gerührt wurden, enthielten sehr viele kleine „stäbchenförmige“ Aggregate, die die Lösung milchig erscheinen ließen. Der Vergleich zu den Schüttelproben, welche visuell betrachtet ebenfalls milchig, aber auch flockig aussahen, brachte im Mikroskop ein ganz anderes Erscheinungsbild hervor. Die bei Raumtemperatur (RT) geschüttelten Lösungen enthielten „fasrige“ Aggregate, die ein Netz innerhalb der Lösung ergaben (Abb. 4.2.9), und ließen sich damit deutlich von den Rühr- und Begasungsstress-Proben unterscheiden.



Abbildung 4.2.8 Visuelle Kontrolle der gestressten PBS-gepufferten Cetuximab-Proben mit und ohne 0,01% Tween 80 nach 48 h Scherstress, Begasungsstress und Schüttelstress

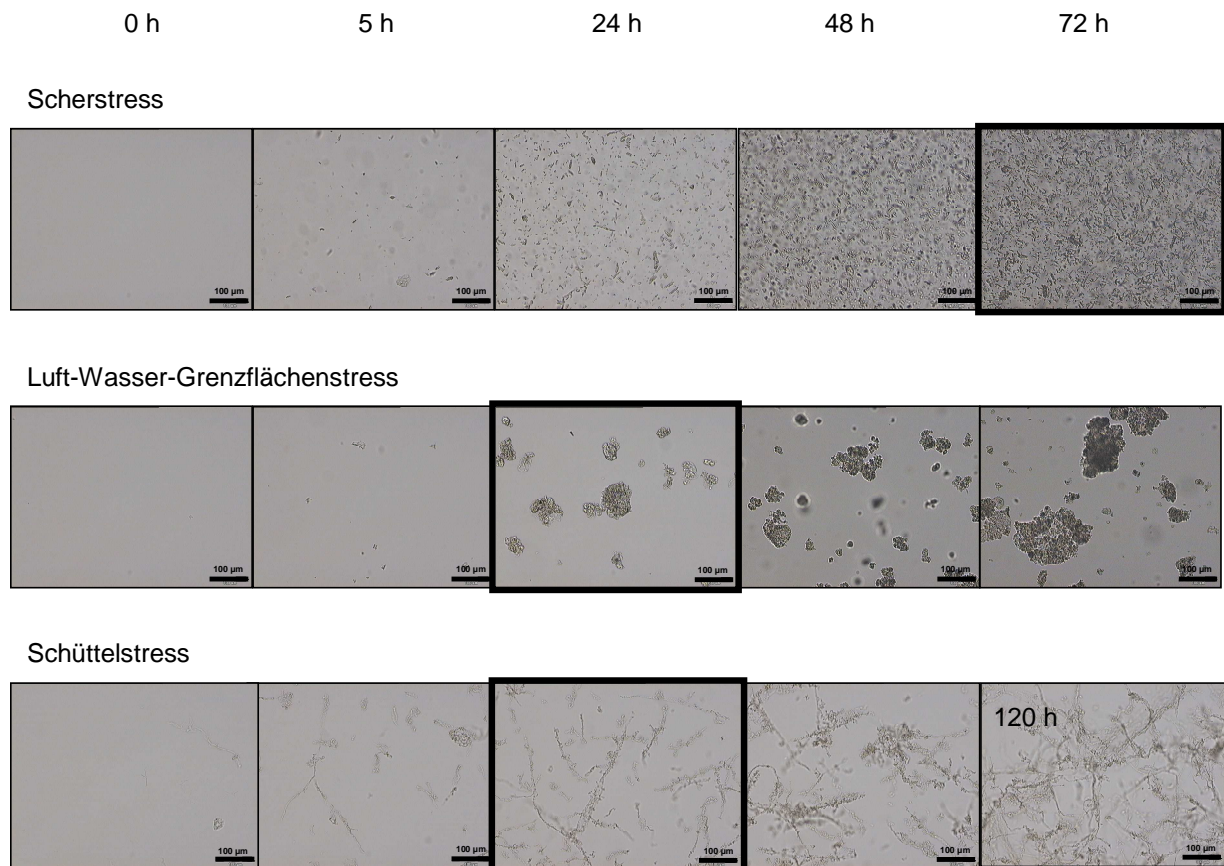


Abbildung 4.2.9 Mikroskopische Aufnahmen von PBS-gepufferten Cetuximab-Lösungen ohne Tween 80 gestresst mit Scher-, Begasungs- und Schüttelstress nach unterschiedlichen Stresszeiten (Messbalken entspricht 100 µm); Die Proben aus den umrahmten Bildern zeigen in der SEC annähernd denselben Monomergehalt

Die Trübungswerte, die mittels UV/VIS-Spektroskopie ermittelt wurden (Abb. 4.2.10), waren konform mit den Ergebnissen der visuellen und mikroskopischen Kontrolle. Die Trübungen nahmen in allen Versuchen mit zunehmender Stresszeit zu. Die größte Trübung trat bei den Schüttelstressversuchen auf, die geringste Trübung bei den Begasungsstress-Versuchen, wenn die Versuche über die Stresszeit miteinander verglichen wurden. Um festzustellen, ob das Schütteln in diesem Fall auch der intensivste Stress war, wurde der Monomergehalt bei den verschiedenen Stressmethoden mittels SEC gemessen (Abb. 4.2.11). Hier zeigten die Proben des Schüttelversuches einen starken Monomergehaltsabfall, ebenso wie die Proben des Begasens. Die Monomergehalte in den Proben des Rührstresses fielen im Gegensatz dazu nicht so stark ab.

Um die Ergebnisse aber angemessen miteinander vergleichen zu können, sollte eine gleiche Stressstärke vorausgesetzt werden. Dass dies hier für die verschiedenen Stressbedingungen

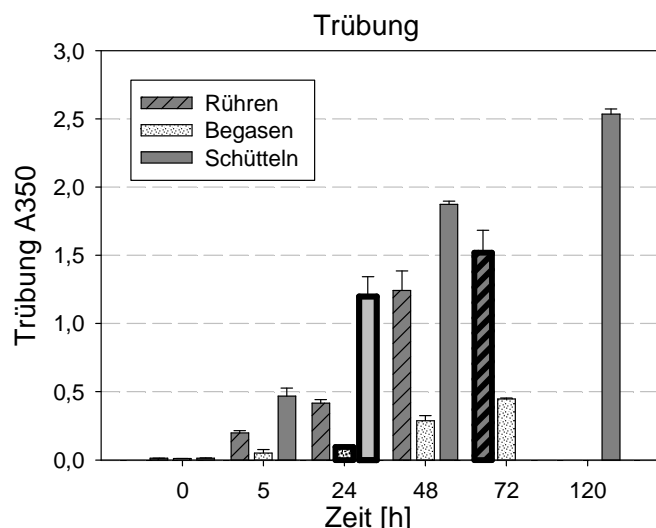


Abbildung 4.2.10 Trübungswerte (UV/VIS-Spektroskopie) von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung nach Scher-, LWG- und Schüttelstress. Die Proben aus den umrahmten Balken zeigen in der SEC annähernd denselben Monomergehalt. Rühren und Begasen wurde bis 72 h durchgeführt, Schütteln wurde bis 120 h durchgeführt (ohne einen 72 h Wert)

nicht vorliegt, kann an den unterschiedlichen Monomergehaltsabnahmen über die Stresszeit gesehen werden. Aus diesem Grund sollen im Folgenden die Ergebnisse des Schüttelstresses nach 24 h mit denen des Begasungsstresses nach 24 h und denen des Rührstresses nach 72 h verglichen werden, denn nach diesen Stresszeiten ergaben sich ungefähr gleiche Monomergehaltsabfälle (vgl. Abb. 4.2.11). In Abb. 4.2.9 sind die zu vergleichenden mikroskopischen Bilder eingerahmt. Auch in Abb. 4.2.10 sind die entsprechenden Werte hervorgehoben. Rühren und Schütteln der Lösungen ergaben in diesem Vergleich annähernd gleiche Trübungen im Gegensatz zum Begasungsstress, der sehr viel geringere Trübungen verursachte. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass hier nur wenig große Präzipitate entstanden waren. Hingegen erschienen die Proben nach Rühren im Mikroskop als stark zerstört, mit sehr vielen sehr kleinen Aggregaten, die das Mikroskopbild dunkel erscheinen ließen. Obwohl für alle drei Stressmethoden gleiche Monomergehalte detektiert wurden, zeigten also sowohl Trübungsergebnisse als auch mikroskopische Aufnahmen unterschiedliche Ergebnisse für die verschiedenen Stressmethoden.

Mittels SEC wurde der Anteil an löslichen Aggregaten bestimmt (Abb. 4.2.11). Nur der Schüttelstress führte zu einem Anstieg der Konzentration an löslichen Aggregaten (3%), während Begasungs- und Rührstress keine Veränderung bezogen auf den Startwert erkennen ließen. Anscheinend entstehen in den gerührten und begasten Proben direkt größere Aggregate. Degradationsprodukte wurden ebenfalls über die SEC detektiert, hier änderten sich die Anteile allerdings nicht im Vergleich zum Startwert.

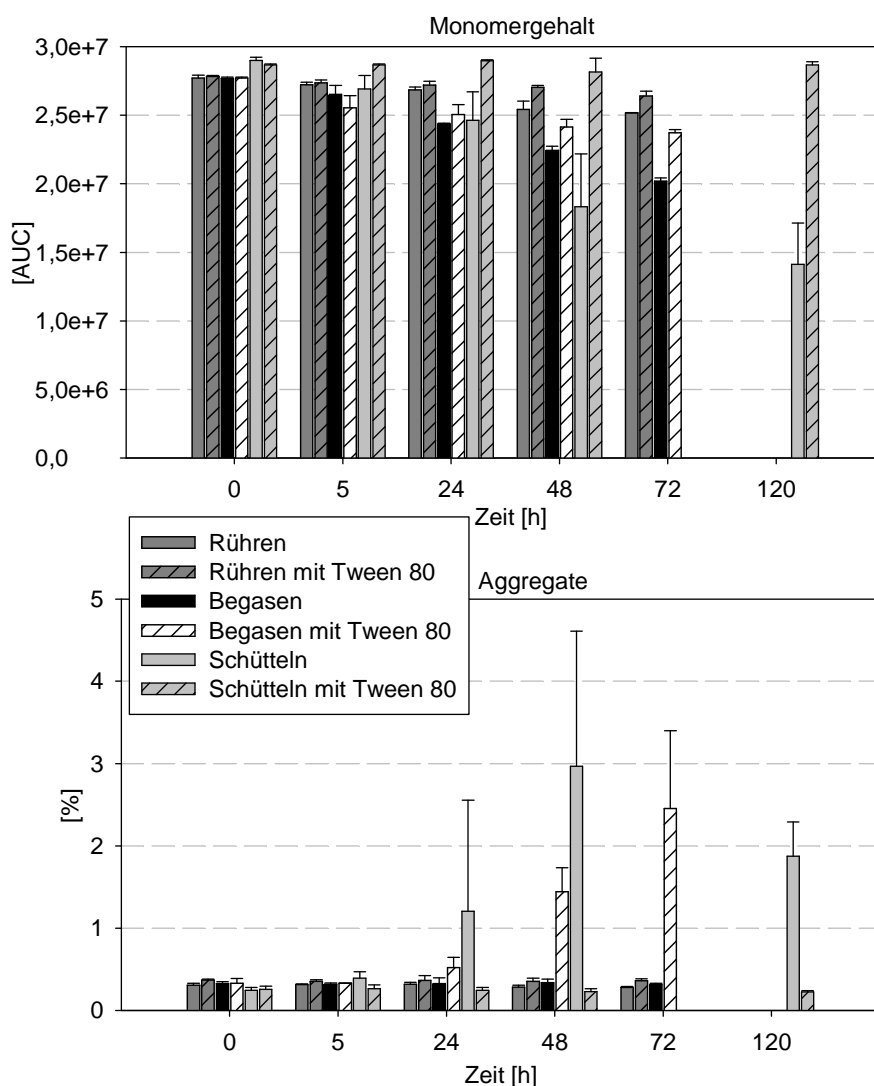


Abbildung 4.2.11 Monomergehalte (SEC) und lösliche Aggregate (SEC) von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit und ohne 0,01% Tween 80 nach verschiedenen Stresszeiten (Schüttelproben keine 72 h Werte, sondern 120 h)

Die Proben wurden außerdem über die Lichtblockade genauer begutachtet (Partikel zwischen 2-30 μm). In Abb. 4.2.12 sind die Verteilungen der Aggregatgrößen (> 2 μm) für die drei Stressmethoden nach 48 h Stresszeit dargestellt. Wie man in der Abbildung sehr gut erkennen kann, ergeben sich sehr unterschiedliche Verteilungen. Das Rühren ergab sehr viele kleine Partikel (um 2-3 μm) und kaum große Partikel (> 15 μm). Das Schütteln erzeugte eine ähnliche Partikelgrößenverteilung, allerdings wurden hier mehr Partikel zwischen 5-10 μm und auch einige >15 μm detektiert. Nach Begasen der Proben wurde insgesamt die geringste Anzahl Partikel/Aggregate detektiert (andere Skala), allerdings waren diese dafür sehr viel größer und zeigten eine viel breitere Größenverteilung. Allerdings muss beachtet werden,

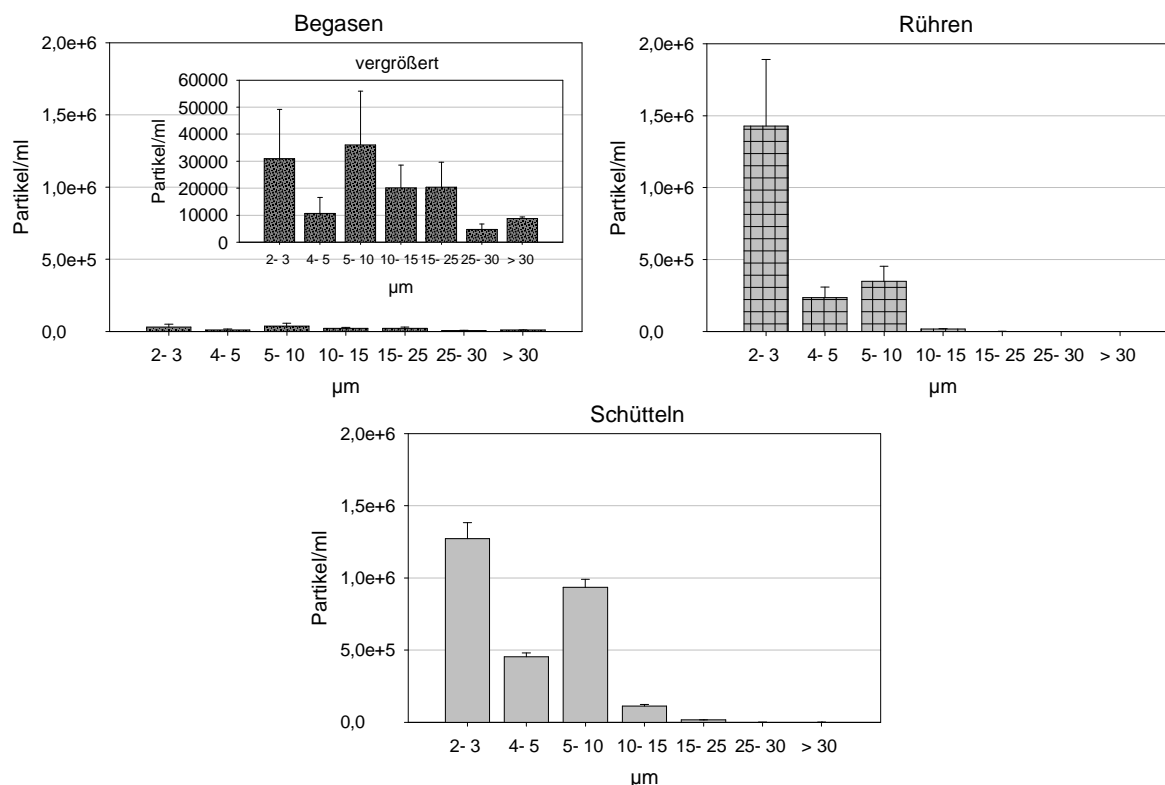


Abbildung 4.2.12 Lichtblockade-Ergebnisse des Rühr-, Begasungs- und Schüttelstressversuches im Vergleich nach 48 h; kleine Grafik: vergrößerte Skala für dasselbe Ergebnis (Begasungsstress)

dass das Gerät nur einen Größenbereich bis 100 µm erfassen kann. Tatsächlich aber, wie in den mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.2.9) schon beobachtet werden konnte, sind nach 72 h sogar noch größere Aggregate entstanden. Da der Monomergehalt nach dem Begasungsstress fast ebenso stark abgenommen hatte wie der nach dem Schüttelstress, scheinen diese wenigen großen Partikel/Aggregate in den begasten Proben einen erheblichen Anteil an Proteingehalt auszumachen, denn lösliche Aggregate wurden in den Proben beider Stressarten nicht detektiert.

Es bleibt die Frage, warum durch den Begasungsstress viele große Aggregate entstanden, während dies bei den anderen beiden Stressarten nicht der Fall war. Möglicherweise ist die mechanische Belastung, die beim Rühren und Schütteln im Vergleich zum Begasen verstärkt auftritt, der Grund dafür. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die 72 h begaste Probe anschließend für eine Stunde gerührt (also geschert) und danach analysiert, um zu sehen, ob die großen Aggregate durch die mechanische Belastung in Kleinere zerteilt würden. In Abb. 4.2.13 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Nach einer Stunde Rühren sahen die Aggregate unter dem Mikroskop in Form und Größe genauso aus wie vor dem Rühren. Auch die Lichtblockade-Ergebnisse zeigten keine signifikante Zunahme der kleinen Partikelfractionen.

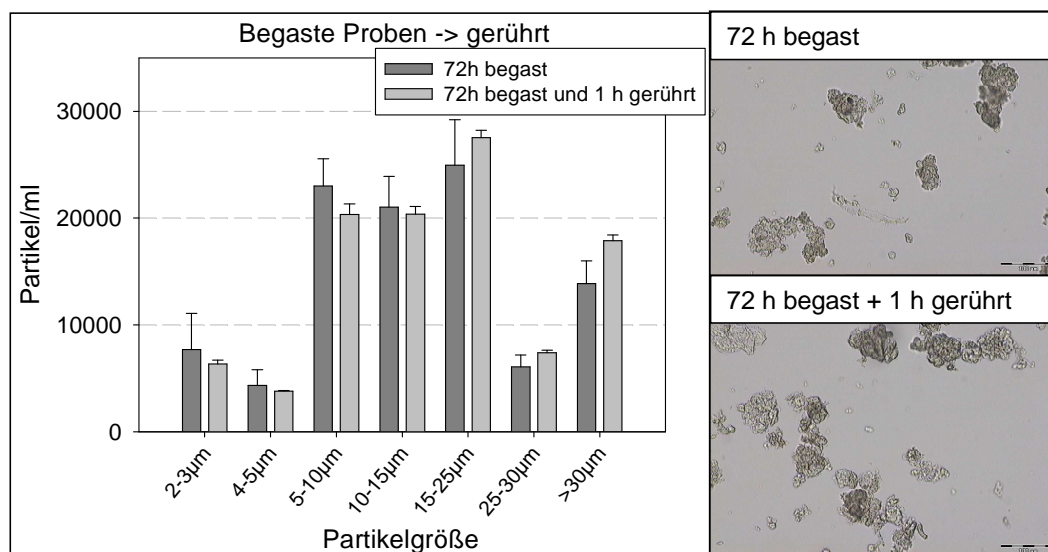


Abbildung 4.2.13 Lichtblockade-Ergebnisse (links) und mikroskopische Aufnahmen (rechts) der 72 h begasten Probe vor und nach 1 h Rühren

Die Partikelfraktion $> 30 \mu\text{m}$ nahm nach dem Rühren sogar minimal zu. Dieses Ergebnis lässt den Rückschluss zu, dass die entstandenen Aggregate sich durch eine mechanische Belastung nicht zerstören lassen. Allerdings könnte die fehlende mechanische Belastung beim Begasen in den Anfängen der Aggregatbildung eine Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die detektierten Instabilitäten nach Schütteln sich weder mit denen des hier verwendeten Rührstresses (Scherung) noch mit denen des hier verwendeten Begasungsstresses (Luft-Wasser-Grenzfläche, LWG) vergleichen lassen. Schütteln führt zu „fasrigen“ Aggregaten, deren Größen, den Ergebnissen der Lichtblockade-Messung zufolge, zwischen denen des Rührstresses und denen des Begasungsstresses liegen. Nach Begasungsstress waren die detektierten Aggregate sehr groß, konnten nicht durch Rühren zerstört werden und auf Grund der geringen mechanischen Belastung konnten sie zu großen Präzipitaten heranwachsen. Die Aggregate nach Scherstress hingegen waren sehr klein, verursachten schon nach sehr kurzer Zeit eine starke Trübung und durch die hohe mechanische Belastung war ein Anwachsen von großen Präzipitaten nicht möglich. Nur den Monomergehalt betrachtend ist das Begasen unter den gewählten Bedingungen besser mit dem Schüttelstress vergleichbar als das Rühren, da das Rühren hier einen geringeren Stress erzeugte. Dies wäre wieder ein Hinweis dafür, dass die LWG stärker als die Scherung an der Stressursache beteiligt ist.

4.2.2.2 Einfluss von Tween 80 auf den Antikörper während der verschiedenen Stressbedingungen

Der Einfluss von Tween 80 auf die Aggregatbildung und auf die Stabilität des Cetuximabs wurde für die drei Stressbedingungen untersucht, indem in die Cetuximab-Lösung 0,01% Tween 80 gegeben wurde. Es wurde der Fragestellung nachgegangen, ob Tween 80 besser dem mechanischen Stress (Rühren) oder dem Luft-Wasser-Grenzflächenstress (Begasen) entgegenwirkt. Dazu wurden die mit Tween 80 versetzten Lösungen im Vergleich zu den nicht-tweenhaltigen Lösungen wieder mit jeweils drei Proben gestresst.

Die visuelle Kontrolle zeigte, dass im Vergleich zu den nicht-tweenhaltigen Lösungen bei allen drei Stressarten eine erheblich geringere Trübung auftrat (Abb. 4.2.8). Allerdings schien es so, als ob in den tweenhaltigen Proben die geringste Trübung beim Schütteln und die stärkste Trübung beim Rühren beobachtet werden konnte. Die Trübungsergebnisse mittels UV/VIS-Spektroskopie zeigten ein ähnliches Ergebnis (Abb. 4.2.14). Die geschüttelten und begasten Proben mit Tween 80 hatten eine schwächere Trübung als die gerührten Proben. Im Vergleich mit den nicht-tweenhaltigen Proben konnte die Trübung am besten beim Schütteln herabgesetzt werden.

Unter dem Mikroskop zeichnete sich Ähnliches ab (Abb. 4.2.15). Wie auch schon bei den nicht-tweenhaltigen Proben wurden nach dem Rühren sehr viele kleine Aggregate und nach

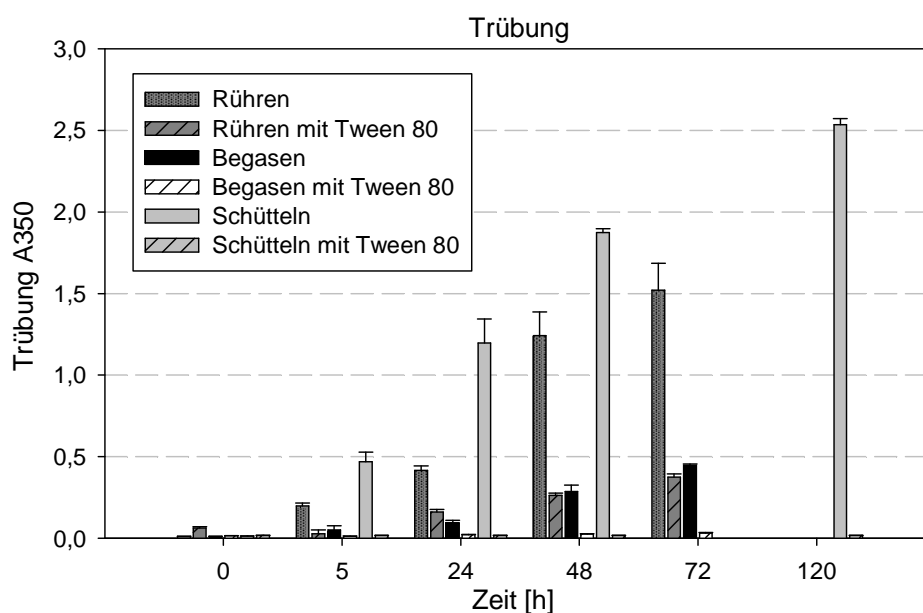


Abbildung 4.2.14 Trübungsergebnisse von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml mit und ohne 0,01% Tween 80 nach verschiedenen Stresszeiten und -arten (Schüttelproben nach 120 h statt nach 72 h vermessen)

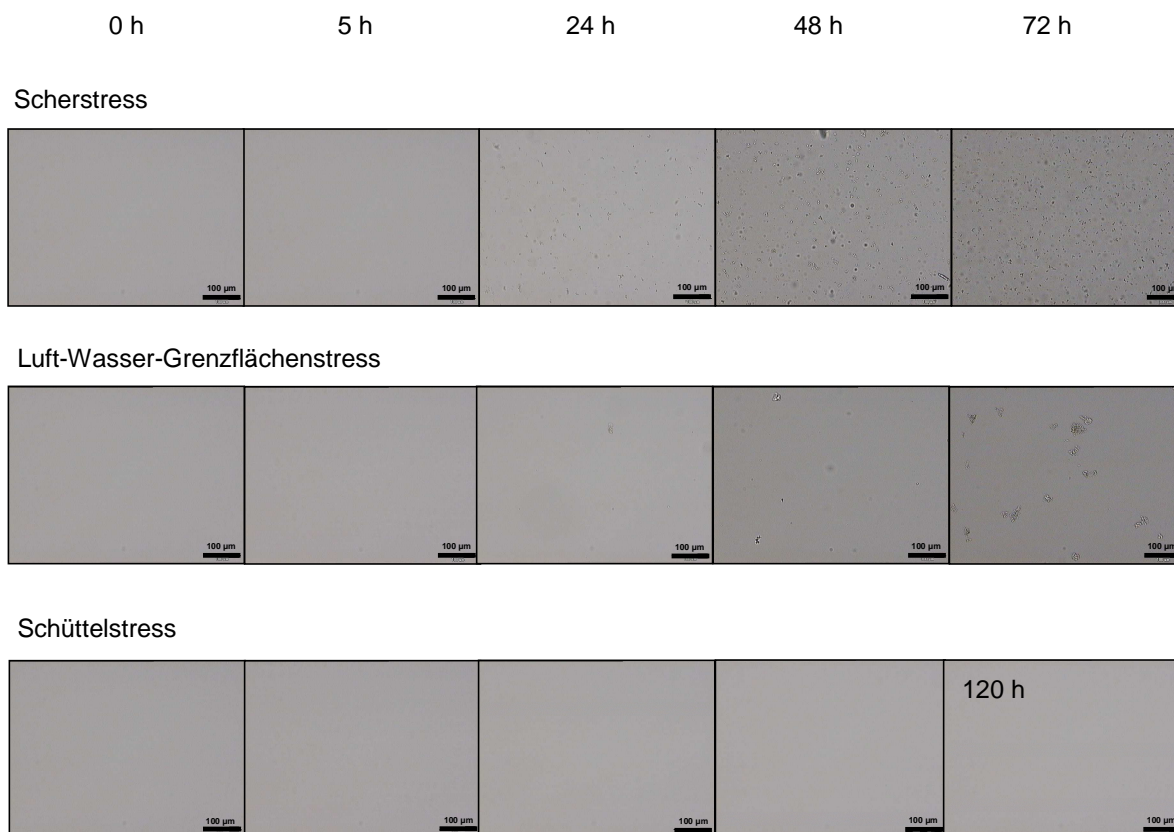


Abbildung 4.2.15 Mikroskop-Aufnahmen von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 5 mg/ml mit 0,01% Tween 80 nach verschiedenen Stresszeiten und –arten (Messbalken entspricht 100 µm)

dem Begasen wenige große detektiert. Die tweenhaltigen Proben zeigten prinzipiell dasselbe Erscheinungsbild wie die nicht-tweenhaltigen Proben, nur eine geringere Anzahl von Aggregaten. Tween 80 wirkte beim Schütteln als stabilisierendes Agens am besten, hier wurden keine Aggregate im Mikroskop gefunden.

Betrachtet man die SEC-Ergebnisse (Abb. 4.2.11), ist zu erkennen, dass das Tween auch in Bezug auf den Monomergehalt dem Schüttelstress am besten vorbeugen konnte, denn die Proben mit Tween zeigten kaum Monomergehaltsverlust im Vergleich zu den nicht-tweenhaltigen Proben. Im Gegensatz dazu stabilisierte beim reinen Begasungsstress das Tween nicht so gut, denn hier fielen die Monomergehalte der tweenhaltigen Proben ab. Der Rührstress war in seiner Stärke recht gering (siehe geringer Monomergehaltsabfall der nicht-tweenhaltigen Proben), somit zeigten auch die tweenhaltigen Proben nur einen ganz minimalen Monomergehaltsabfall. Tween 80 stabilisierte in diesem Versuch anscheinend gegen Schüttelstress besser als gegen Begasungsstress. Dieses Ergebnis wurde so nicht vermutet, da angenommen wurde, dass Begasungsstress (große LWG) und nicht Schüttelstress durch das Anlagern von Tween an der Grenzfläche am besten hätte reduziert werden müssen.

Die Detektion der löslichen Aggregate zeigte, dass das Rühren auch in der tweenhaltigen Probe keinen Anstieg an löslichen Aggregaten bewirkte (Abb. 4.2.11). Das Begasen zeigte nur bei der tweenhaltigen Probe und das Schütteln nur bei der Probe ohne Tween einen Anstieg an löslichen Aggregaten.

Beim Rühren ist diese Beobachtung darauf zurückzuführen, dass direkt größere Aggregate entstanden sein müssen, die im Mikroskop zu erkennen waren, obwohl die dort gesehenen Aggregate im Vergleich zu den anderen Stressmethoden recht klein waren. Mit der Lichtblockade (Abb. 4.2.16) wurden ebenfalls die meisten Partikel im Vergleich der tweenhaltigen Lösungen in der Probe nach Rühren festgestellt. Diese waren zwischen 2-3 μm groß. Die größeren Aggregate bis 10 μm , die in den nicht-tweenhaltigen Proben detektiert wurden, konnten unter Tweeinfluss hier nicht mehr entstehen.

Beim Begasen bewirkte das Tween, dass sich die Aggregate anscheinend nicht so schnell vergrößerten, so dass in diesem Fall auch lösliche Aggregate in der tweenhaltigen Probe detektiert werden konnten. Eine sehr breite Aggregatgrößenverteilung konnte mittels Lichtblockademessung (Abb. 4.2.16) gemessen werden, vor allem auch sehr große (>30 μm) Aggregate wurden gemessen. Hier schien das Tween recht gut zu stabilisieren, denn die Partikelanzahl nahm vergleichend zu den anderen Stressarten erheblich ab (Abb. 4.2.16).

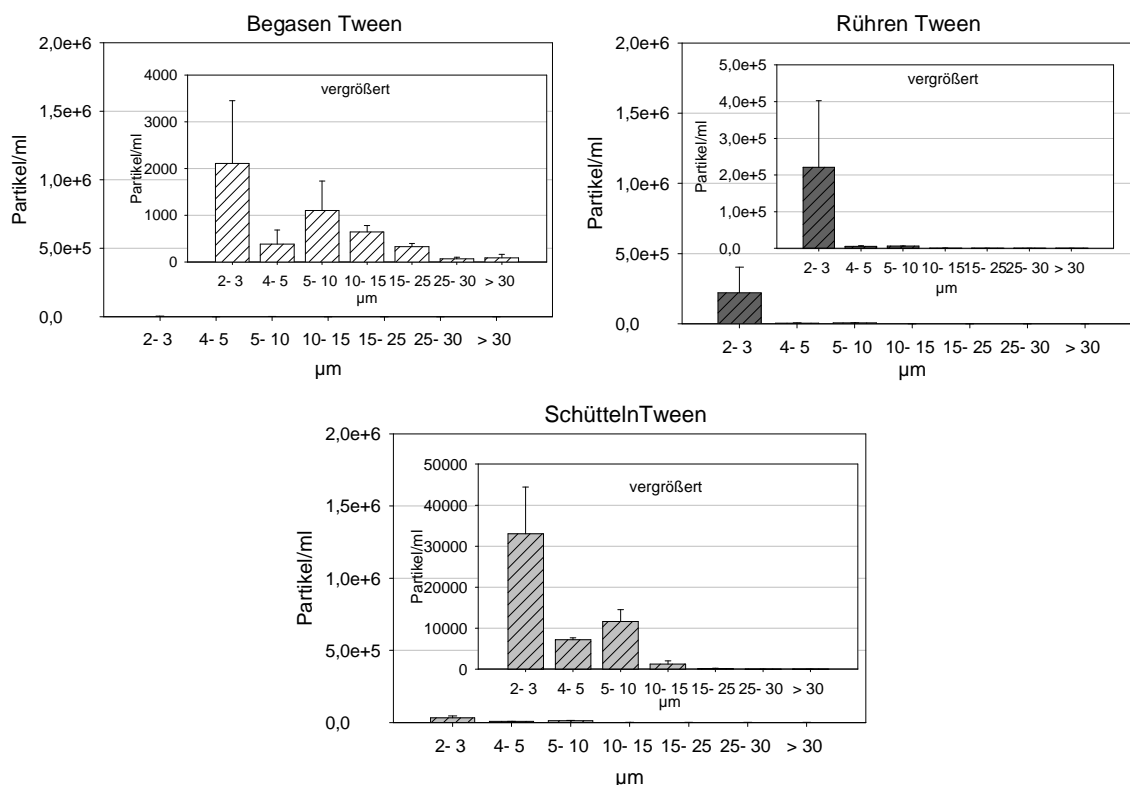


Abbildung 4.2.16: Ergebnisse der Lichtblockade-Messungen der PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung (5 mg/ml) mit 0,01% Tween 80 nach 48 h (Skala entspricht der in Abb. 4.2.12; innen Vergrößerungen)

Beim Schütteln konnten in der nicht-tweenhaltigen Probe lösliche Aggregate detektiert werden (allerdings nur 3%), deren Bildung durch die Zugabe von Tween komplett verhindert werden konnten. Allerdings konnte man in den Lichtblockade-Messungen dieser Proben (Abb. 4.2.16) Partikel erkennen. Das bedeutet, dass die Entstehung von Aggregaten durch Tween nicht komplett vermieden werden konnte. Allerdings wurden die Aggregate anzahlmäßig so gering gehalten, dass sie weder unter dem Mikroskop noch in der Trübungsmessung detektiert werden konnten. Die Aggregate in den Lichtblockademessungen lagen in Größe und Anzahl zwischen denen des Begasens und denen des Rührens mit Tween, anzahlmäßig konnte eine Reduktion festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte im Vergleich zu den nicht-tweenhaltigen Proben (Abb. 4.2.13) bei allen drei Stressarten in der Lichtblockade eine Reduktion der Anzahl der Aggregate durch den Zusatz von Tween erkannt werden. Beim Rühren und Begasen konnte auch eine leichte Verschiebung zu geringeren Aggregatgrößen beobachtet werden, so dass in den begasten Proben mit Tween auch lösliche Aggregate detektiert werden konnten. Die Zugabe von Tween stabilisierte am besten beim Schütteln, verglichen mit den anderen Stressmethoden.

4.2.2.3 Zusammenfassende Diskussion

Dieser Versuch sollte, wie auch schon die Simulation, feststellen, welche Stressart hauptsächlich zu den in den Schüttelversuchen detektierten Instabilitäten führt, Scherstress oder LWG-Stress. Beide Stressarten werden in der Literatur als Ursachen für Instabilitäten diskutiert [Harrison et al. 1998; Maa und Hsu 1996; Oliva et al. 2003]. Allerdings sind diese Stressarten nicht einfach voneinander zu trennen. Dies konnte auch in dem vorliegenden Versuch gesehen werden. Das Rühren ohne Luft produzierte vorzugweise Scherstress, andererseits waren aber auch Grenzflächen zu Stopfen, Glaswand und Magnetrührstäbchen vorhanden. Das Begasen der Lösung mit Luft erzeugte eine sehr große Luft-Wasser-Grenzfläche, auf der anderen Seite ergab sich durch die Luft, die durch die Lösung strömte, auch eine Bewegung, die ein Scheren z.B. an der Glaswand verursachen konnte.

Das Begasen der Antikörperlösung ergab große Präzipitate, die einen starken Monomergehaltsabfall verursachten. Das Auftreten dieser Präzipitate oder Aggregate konnte durch Tween reduziert werden. Sie waren nicht durch Rühren zerstörbar und ihre Größenverteilung war im Vergleich aller untersuchten Stressmethoden hier am breitesten.

Der Rührstress ohne Luft wiederum führte zur Bildung sehr vieler, sehr kleiner Aggregate. Aber es konnten keine löslichen Aggregate detektiert werden, wie auch schon in Kapitel 4.1.1 beobachtet, obwohl dort Luft im Vial zugegen war (siehe Anhang A4, Tab. A.4). Die

Lösungen waren stark trüb, der Monomergehaltsabfall aber nur gering. Das zeigt, dass eine starke Trübung nicht zwangsläufig auf einen großen Aggregatgehalt bzw. Monomergehaltsabfall hinweisen muss. Das Tween konnte auf die Trübung bezogen hier im Gegensatz zum Schütteln nur eine geringe Schutzwirkung hervorbringen.

Betrachtet man die mit Luft durchgeführten Rühr-Versuche aus Kapitel 4.1.1, unterscheiden sie sich von den hier diskutierten Ergebnissen. Sobald Luft zugegen ist und die volumenbezogene LWG durch z.B. Füllmengenerniedrigung erhöht wird, kann Tween besser wirken und eine Unterscheidung in den Monomergehalten zwischen der Marktformulierung und der PBS-gepufferten Lösung konnte erreicht werden (siehe Kapitel 4.1). In Anwesenheit von Luft sank der Monomergehalt auch viel stärker, wenn er nicht durch Tween stabilisiert wurde, als in dem hier dargestellten Versuch. Dies zeigt, dass Luft bzw. LWG offenbar auch in den Rührversuchen einen wesentlichen Stressfaktor darstellt. Auch unter dem Mikroskop konnte man zwar dieselben kleinen Aggregate erkennen, allerdings klebten diese in Anwesenheit von Luft teilweise aneinander (Abb. 4.1.24). Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass eine LWG einen destabilisierenden Einfluss auf Antikörper während mechanischen Stresses hat.

Die Anzahl der Aggregate, die durch Schütteln erzeugt wurden, lag zwischen denen des Begasens und des Rührens. Auffällig war, dass nur hier lösliche Aggregate beobachtet werden konnten, die durch Zugabe von Tween sogar verschwanden. Dies ist ein gegenteiliger Effekt zu den begasten Proben, in welchen erst durch Zugabe von Tween lösliche Aggregate entstanden. Ansonsten verringerte Tween in den geschüttelten Proben nur die Anzahl der Aggregate.

Keine der beiden alternativen Stressarten zeigte dieselben Ergebnisse wie der Schüttelstress. Es kann zwar gefolgert werden, dass sowohl Scherstress als auch LWG-Stress Aggregate und Instabilitäten in Antikörperlösungen verursachten, allerdings konnte der Schüttelstress nicht hauptsächlich einer der beiden Stressart zugeordnet werden. Daher ist zu vermuten, dass es sich beim Schüttelstress um eine andere oder um eine kombinierte Stressart handeln muss. Die möglichen Gründe für die Unterschiede der Aggregate in Form und Größe, die in diesem Fall entstanden sind, sollen im Folgenden diskutiert werden.

Eine Hypothese könnte sein, dass die Präzipitate, die durch das Rühren entstehen, durch die Scherkräfte zerkleinert werden und aus diesem Grund sehr viel kleiner sind als die des Begasens. Um dies zu überprüfen, wurden die begasten Proben ebenfalls für eine Stunde gerührt. Allerdings änderte sich die Größe und der Habitus der Präzipitate dadurch nicht, was

dafür spricht, dass die Präzipitate schon zu groß und zu kompakt waren, um durch Rühren wieder zerstört werden zu können (Abb. 4.2.14).

Eine andere Überlegung wäre, dass der Start der Aggregation durch einen Initiationskeim verursacht wird, der beim Begasen langsam wachsen kann, da die hydrophoben Gruppen nach außen präsentiert werden können und sich immer mehr neue Antikörper anheften (siehe Abb. 2.2.1, allgemeiner Teil). Tween 80 stabilisiert die hydrophoben Bereiche der Aggregate, so dass sich die großen Aggregate nicht mehr aneinander heften können und das Wachstum teilweise auf der Stufe von löslichen Aggregaten stehen bleibt (Abb. 4.2.11). Ähnliche Ergebnisse konnten auch schon früher ermittelt werden [Kreilgaard et al. 1998; Mahler et al. 2005b]. Weiterhin könnte die oben genannte Hypothese auch auf das Rühren übertragen werden. Dort verursacht der Initiationskeim Aggregate, die aber immer wieder zerschlagen werden, daraus resultieren dann viele kleine Aggregate. Dies ist allerdings nur eine Vermutung und mit den hier durchgeführten Versuchen nicht zu beweisen.

Eine starke Trübung, eine ebenfalls nicht ausreichende Wirkung des Tween 80 und kaum einen Unterschied zu Schüttelproben in der Aggregatgröße (Lichtblockademessung) konnte in Rührversuchen mit Luft im Vergleich zu Schüttelstressversuchen, allerdings unter anderen Versuchsbedingungen, früher schon beobachtet werden [Mahler et al. 2005b]. In der hier vorgelegten Arbeit wurde aber ein deutlicher Unterschied der Aggregatgrößen nach Rühren (ohne Luft) verglichen mit Schütteln (Lichtblockademessung) detektiert. Das kann an der fehlenden Luft innerhalb des Vials gelegen haben, die anscheinend notwendig ist, damit die Aggregate größer als 10 μm werden und aneinanderheften. Auch Kiese et al. fanden in der Lichtblockademessung größere Aggregate in nicht-tweenhaltigen Proben nach Rühren mit Luft [Kiese et al. 2008]. Weitere Abweichungen der früheren Versuche zu den hier gezeigten lassen sich wahrscheinlich auf andere Rühr- und Schüttelparameter zurückführen. Wie auch schon in Kap. 4.1 gezeigt werden konnte, hat dies einen erheblichen Einfluss auf die erhaltenen Aggregate.

Die Frage, ob der Stress, der Proteine aggregieren lässt, eher aus Scherung oder durch den Kontakt mit hydrophoben Oberflächen (LWG) besteht, wurde auch in anderen Literaturstellen mit anderen Stressmethoden schon untersucht [Maa und Hsu 1996; Maa und Hsu 1997; Oliva et al. 2003]. Scherstress beschädigte in den publizierten Versuchen die untersuchten Proteine nicht. Die meisten Literaturstellen postulieren, dass eine Kombination von Scher- und LWG-Stress zu Aggregationen führt [Harrison et al. 1998; Patapoff und Esue 2009], was auch in der vorliegenden Arbeit anhand der vorliegenden Versuche vermutet werden könnte. Dennoch konnten auch in dem Rührversuch ohne Luft Aggregate detektiert werden. Die hier fehlende

LWG könnte durch andere hydrophobe Oberflächen wie die des Magnetrührstäbchens, der Glaswand oder des Stopfens ersetzt worden sein.

Nach der Literatur stabilisieren Tenside wie Tween bei Stressarten wie LWG-Stress sehr gut [Katakam et al. 1995; Kerwin 2007]. Unter diesem Aspekt war das hier erhaltene Ergebnis überraschend. In der Literatur ist beschrieben, dass der stabilisierende Effekt eines Tensids auch von der gewählten Stressmethode abhängt [Charman et al. 1993; Daugherty und Mrsny 2006; Jones et al. 1997]. Also scheint in diesem Fall das Tween 80 gerade beim Schüttelvorgang seine beste Stabilisierungseigenschaft zu entfalten. Grund dafür könnte, wie oben schon geschildert, das Anlagern des Tween an die LWG sein, was beim Begasen durch die Geschwindigkeit der aufsteigenden Bläschen nicht so gut möglich war. Oder prozentual gesehen war die Luft-Wasser-Grenzfläche während des Begasens doch geringer als während des Schüttelns, da hier die Vials mit 50 ml anstelle mit 1 ml wie im Schüttelststressversuch gefüllt waren.

Außerdem hat auch die Konzentration und das Molekulargewicht des Proteins einen großen Einfluss darauf, ob sich ein Protein an einer Grenzfläche entfaltet bzw. zur Schaumbildung neigt und denaturiert oder nicht [Martin et al. 2002]. So verhalten sich unterschiedliche Proteine unterschiedlich an LWGs [Ortega-Vinuesa et al. 1998]. Da in dem vorliegenden Versuch nur Cetuximab und nur Tween 80 getestet wurde, könnte mit einem anderen Tensid und einem anderen Protein das Ergebnis anders ausfallen.

Abschließend lässt sich sagen, dass mit diesem Versuch gezeigt werden konnte, dass das Schütteln sich nicht nur einer Stressart wie Rühren (Scheren) oder Begasen (LWG-Stress) zuordnen lässt. Wahrscheinlich ist es eine Kombination von verschiedenen Einflussfaktoren, die, wie auch schon in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, sehr von den Stressparametern abhängt und unterschiedliche Ergebnisse/ Instabilitäten erzeugen kann. Tenside wie Tween 80 schützen davor, allerdings bedarf es noch einer tiefergehenderen Forschung, um die Wirkweise von Tween 80 auf IgG-Proben beim Schütteln beurteilen zu können.

4.3 Arbeiten mit hochkonzentrierten Antikörperlösungen

In der vorliegenden Arbeit wurden bisher Stressversuche mit Antikörperlösungen einer relativ geringen Konzentration von 2-5 mg/ml vorgestellt. Stabilisierende Zusätze wie Tween 80 konnten eine auftretende Aggregation meist verhindern. Darüber hinaus gibt es aber auch noch andere Faktoren, die ebenfalls stabilisierend auf Proteine bei physikalischem Stress wirken können, wie z.B. die Proteinkonzentration [Sluzky et al. 1991; Treuheit et al. 2002]. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde in dem vorliegenden Kapitel eine Cetuximab-Lösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml geschüttelt. Um den Einfluss der Konzentration mit den anderen Einflussgrößen wie Füllmenge, Schüttelgeschwindigkeit und Schüttelzeit vergleichen zu können, wurde ein Statistisches Versuchsdesign zugrunde gelegt. Da eine hohe Konzentration auch in anderer Hinsicht (z. B. einer *i.m.* oder *s.c.* Gabe anstelle einer *i.v.* Gabe) einen Vorteil bietet, ist die Entwicklung von Arzneimitteln mit solchen Konzentrationen pharmazeutisch von hohem Interesse. Um solch eine Konzentration aber zu erlangen, müssen die Antikörperlösungen nach dem Aufreinigungsprozess aufkonzentriert werden. Dies kann mittels Tangentialstromfiltration, Dialyse, oder Filtration mittels Zentrifugalkonzentratoren oder Rührzelle durchgeführt werden. Alle diese Aufkonzentrierungstechniken stellen ebenfalls mechanischen Stress für die Antikörper dar und wurden aus diesem Grund ebenfalls in diesem Kapitel untersucht. Ziel hierbei war es außerdem, eine vergleichbare Technik zur Tangentialstromfiltration (Großmaßstab) zu finden, die ähnliche Ergebnisse bezüglich Qualität und Stabilität des aufkonzentrierten Produktes liefert.

4.3.1 Schüttelstressversuche mit hochkonzentrierten Antikörperlösungen

4.3.1.1 Vergleich von hochkonzentrierter Antikörperlösung mit gering konzentrierter Antikörperlösung

In diesem Kapitel wurde eine PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung mit 100 mg/ml mit der diskriminierenden Bedingung (2 ml-Vial, 1 ml Füllmenge, 200 U/min, 120 h, Raumtemperatur) geschüttelt. Die Hälfte der Proben wurde unter Zugabe von 0,05% Tween 80 getestet, um die Wirkung des Tweens bei hochkonzentrierten Proteinlösungen zu überprüfen. Die Tweenkonzentration wurde, da auch die Proteinkonzentration angehoben wurde, von den bisher in dieser Arbeit verwendeten 0,01% auf 0,05% erhöht (5 mg/ml Referenzprobe wurde hier ebenso mit 0,05% Tween 80 versetzt). Ob die diskriminierende

Bedingung aus Kapitel 4.1.2 auch noch bei höheren Konzentrationen diskriminierend wirkt, sollte Fragestellung des folgenden Versuches sein. Der Vergleich zu der 5 mg/ml Lösung ist hier dargestellt.

Der Monomergehalt in Abb. 4.3.1 lässt erkennen, dass die hohe Konzentration von 100 mg/ml, wie auch in der Literatur beschrieben [Sluzky et al. 1991], stark stabilisierend wirkte, da kein signifikanter Abfall des Monomergehaltes erkannt werden konnte. Im Gegensatz dazu war bei der geringeren Konzentration von 5 mg/ml ein deutlicher Abfall in der nicht-tweenhaltigen Lösung zu erkennen, welcher durch die Zugabe von Tween aufgehoben wurde. Dies war zu erwarten gewesen (Kapitel 4.1.2). Ob Tween bei der hohen Konzentration von 100 mg/ml auch einen stabilisierenden Einfluss hat, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden, da die Konzentration selbst hier schon den Monomergehaltsabfall verhinderte. Um einen möglichen stabilisierenden Effekt des Tweens zu sehen, muss der Stress angehoben, also z.B. die Schüttelgeschwindigkeit erhöht werden. Dies wurde in einem weiteren Versuch durchgeführt und ist im Unterpunkt 4.3.1.2 dargestellt.

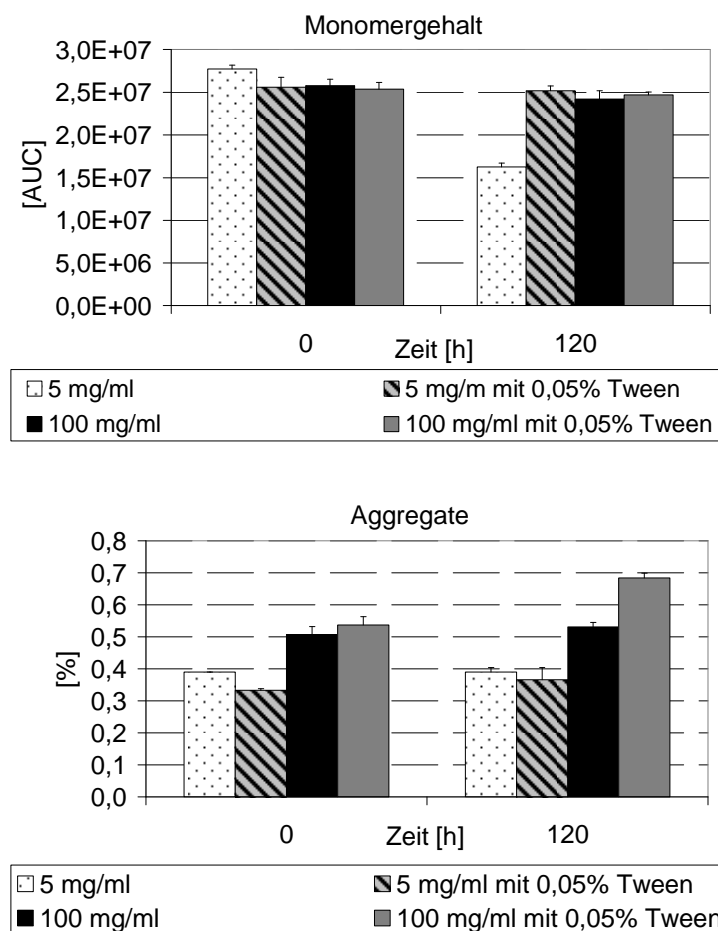


Abbildung 4.3.1 SEC-Ergebnisse: Monomergehalt (oben) und lösliche Aggregate (unten) in PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 5 und 100 mg/ml mit und ohne Tween 80 vor und nach 120 h Schütteln (mit der üblichen diskriminierenden Methode durchgeführt)

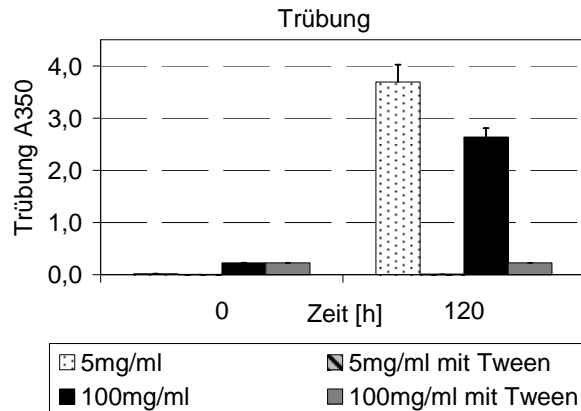


Abbildung 4.3.2 UV/VIS-Trübungswerte von PBS-gepufferten Cetuximab-Lösungen mit 5 und 100 mg/ml mit und ohne Tween 80 vor und nach 120 h Schütteln (mit der üblichen diskriminierenden Methode durchgeführt)

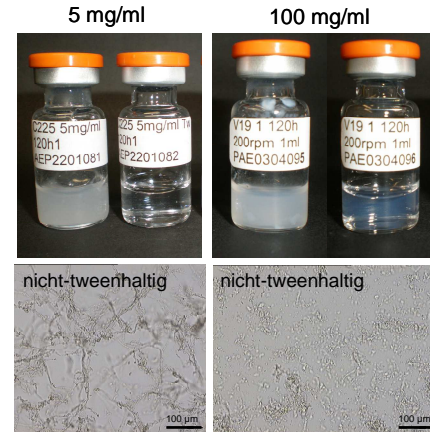


Abbildung 4.3.3 Oben: visuelle Kontrolle von PBS-gepufferten Cetuximab-Lösungen mit 5 und 100 mg/ml ohne (jeweils links) und mit Tween 80 (jeweils rechts) nach 120 h Schütteln; unten: mikroskopische Aufnahmen von 5 und 100 mg/ml Cetuximab-Lösung ohne Tween 80 nach 120 h Schütteln (mit der üblichen diskriminierenden Methode durchgeführt); (Messbalken entspricht 100 µm)

Doch zunächst soll auf die Analysendaten des Versuches genauer eingegangen werden. Interessant ist, dass zwar kein Monomergehaltsabfall, aber ein Anstieg der Trübung (Abb. 4.3.2) in der hochkonzentrierten Cetuximab-Lösung beobachtet werden konnte. Dieser Trübungsanstieg wurde durch Tween verhindert, was für seine stabilisierende Wirkung auch innerhalb hochkonzentrierter Lösungen spricht. Der Anteil an aggregierten Antikörpern, die die Lösung trüb erscheinen ließen, war wohl vermutlich zu gering, um einen signifikanten Monomergehaltsabfall in der hochkonzentrierten Lösung zu bewirken. Dennoch kann eine trübe Lösung, die Aggregate enthält, auch wenn diese sich prozentual im Monomergehalt kaum auswirken, später die Gefahr einer Embolie mit sich bringen [Fradkin et al. 2009; Schellekens 2005]. An dieser Stelle wird erneut deutlich, wie wichtig es in der Proteinanalytik ist, verschiedene analytische Methoden zu verwenden, da auf Grund des Monomergehaltes hier keine Instabilitäten vermutet worden wären.

Die in der UV/VIS-spektroskopischen Messung beobachtete Trübung der nicht-tweenhaltigen Proben konnte auch visuell nicht übersehen werden (Abb. 4.3.3). Und auch die stabilisierende Wirkung von Tween [Lougheed et al. 1983] war visuell gut zu erkennen. Die Opaleszenz, die bei der hochkonzentrierten tweenhaltigen Cetuximab-Lösung auftrat, entstand durch die hohe Konzentration und konnte nicht mit einer Instabilität in Zusammenhang gebracht werden [Sukumar et al. 2004], da auch die ungeschüttelten Startproben (Anhang A6, Tab. A.6) in der visuellen Kontrolle dieselbe Opaleszenz zeigten.

Das Erscheinungsbild der geschüttelten 100 mg/ml-Lösung unterschied sich mikroskopisch von der 5 mg/ml-Lösung (Abb. 4.3.3). Die detektierten Aggregate sahen nicht so „fasrig“ aus, die resultierende Trübung war allerdings ähnlich. Die tweenhaltigen Proben zeigten keine Aggregate unter dem Mikroskop. Eine Begründung für das unterschiedliche Aussehen der verschiedenen Konzentrationen unter dem Mikroskop könnte die relativ erhöhte Wahrscheinlichkeit des Kontaktes von Antikörper zur Luft-Wasser-Grenzfläche (LWG) in einer gering konzentrierten Lösung im Vergleich zu einer hoch konzentrierten Lösung sein [Treuheit et al. 2002]. Es entsteht nämlich beim Schütteln eine annähernd gleiche LWG an beiden Lösungen, aber in der hochkonzentrierten Lösung können sich prozentual weniger Proteine an der Grenzfläche ansammeln als in der geringer konzentrierten Lösung. So kann auch der geringere Monomergehaltsabfall der hochkonzentrierten Lösung im Vergleich zu gering konzentrierten Lösungen erklärt werden. Tween schützt beide Lösungen vor Aggregation, indem es sich selbst an der LWG ansammelt [Kiese et al. 2008]. Ein weiterer Grund für die höhere Stabilität der hochkonzentrierten Lösung kann auch die erhöhte Viskosität der Lösung und demzufolge die veränderte Bewegung der Flüssigkeit beim Schütteln mit folglich veränderter LWG sein. Auch die Durchmischung der Lösung während des Schüttelns ist durch die erhöhte Viskosität sicherlich vermindert.

Der Anteil löslicher Aggregate, der mittels SEC detektiert wurde, stieg in der tweenhaltigen Lösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml an (Abb. 4.3.1) im Gegensatz zu der Lösung mit 5 mg/ml, die keine Veränderung zeigte. Auch die nicht-tweenhaltigen Lösungen zeigten keine Veränderung der löslichen Aggregate. Es ist also auffällig, dass nur in der hochkonzentrierten Lösung mit Tween ein Anstieg an löslichen Aggregaten beobachtet werden konnte. Eine Begründung dafür könnte das Tween sein, was anscheinend auch kleine Aggregate (wie auch unter 4.1.2 schon diskutiert) so stabilisieren kann, dass sie nicht direkt zu unlöslichen Aggregaten (siehe Lösungen ohne Tween) heranwachsen. Diese Stabilisierung tritt in einer höher konzentrierten tweenhaltigen Lösung anscheinend früher auf als in einer geringer konzentrierten tweenhaltigen Lösung. In der gering konzentrierten Lösung reicht die Tweenkonzentration von 0,05% wahrscheinlich aus, um zunächst eine komplette Verhinderung der Aggregatbildung zu bewirken, so dass hier keine löslichen Aggregate detektiert werden konnten.

Auffällig ist weiterhin, dass die hochkonzentrierten Lösungen schon von Start an einen höheren Aggregatgehalt hatten als die 5 mg/ml-Lösungen. Dies bedeutet, dass die Aufkonzentrierung selbst einen Stress für den Antikörper darstellt. Deshalb wird dieses Thema in Kapitel 4.3.3 detailliert behandelt.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass eine Konzentration von 100 mg/ml im Gegensatz zu 5 mg/ml beim Schütteln stabilisierend wirkte, allerdings auch Aggregate in der Trübungsmessung detektiert werden konnten, die aber den Monomergehalt nicht beeinträchtigten. Tween wirkte in diesem Fall ebenfalls stabilisierend, die Trübung in der UV/VIS-spektroskopischen Messung, also die Bildung unlöslicher Aggregate, konnte verhindert werden. Auf den Monomergehalt bezogen war die gewählte Schüttelbedingung für eine Konzentration von 5 mg/ml diskriminierend, für 100 mg/ml aber nicht mehr. Gründe dafür können, wie oben schon diskutiert, der prozentual gesehen geringere Kontakt des Antikörpers zur LWG sein oder die verminderte Bewegung der Flüssigkeit (veränderte LWG), da die hochkonzentrierte Lösung viskoser ist. Aus diesem Grund wurden in dem nachfolgend beschriebenen Versuch die Schüttelintensität und damit die Stressstärke erhöht.

4.3.1.2 Schütteln von hochkonzentrierten Cetuximab-Lösungen bei verschiedenen Schüttelintensitäten

In diesem Versuch wurde die PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung von 100 mg/ml mit und ohne 0,05% Tween 80 bei 200, 250 und 300 U/min geschüttelt (1 ml Füllmenge; 2 ml-Vial; 120 h; 25°C). Eine Erhöhung der Stressstärke sollte eine Diskriminierung zwischen der nicht-tweenhaltigen und tweenhaltigen Lösung hervorbringen.

Die Monomergehalte der hochkonzentrierten Lösungen blieben über 120 h jedoch annähernd gleich und zeigten keinen eindeutigen Verlust (Abb. 4.3.4). Das Schütteln bei 300 U/min ließ am ehesten einen Monomergehaltsabfall im Vergleich zu den Startwerten erkennen, allerdings hätte man hier eine längere Schüttelzeit wählen müssen, um diesen Effekt auch wirklich beurteilen zu können, da er nach 120 h noch recht schwach war. Eine andere Alternative wäre gewesen, die Schüttelintensität noch weiter zu erhöhen. Leider konnte dies aber nicht durchgeführt werden, da 300 U/min schon die maximale Schüttelintensität des Schüttlers darstellte. Das Ergebnis zeigt, dass sogar bei einer Stresserhöhung die hochkonzentrierten Cetuximab-Lösungen kaum Monomere verloren. Im Gegensatz dazu wurde allerdings in der Trübungsmessung (Abb. 4.3.5) mittels UV/VIS-Spektroskopie, wie auch schon in dem unter 4.3.1.1 beschriebenen Versuch, eine erhebliche Trübung detektiert, die mit steigender Schüttelintensität zunahm. Diese Beobachtung zeigt, dass die Lösung unlösliche Aggregate enthielt. Das zugesetzte Tween konnte auch bei 300 U/min vor dieser Aggregatbildung sehr effektiv schützen, so dass in den tweenhaltigen Lösungen dieselben geringen Trübungswerte wie in den Startproben gemessen wurden. Auch hier kann die oben beschriebene Hypothese, nämlich dass bei einer höheren Konzentration prozentual weniger Proteine an der LWG

vorhanden sind und somit diese Lösungen beim Schütteln stabiler sind [Treuheit et al. 2002], die Beobachtungen erklären. Wahrscheinlich nahm die LWG während des Schüttelvorgangs mit höherer Schüttelintensität leicht zu (siehe auch Kapitel 4.2.1.2). Aus diesem Grund konnte ein Anstieg der Trübung in der Trübungsmessung mit schnelleren Schüttelintensitäten detektiert werden, da an der vergrößerten LWG oder vielleicht auch durch erhöhte Scherung mehr Proteine aggregieren konnten. Der Monomergehalt blieb aber stabil, da die LWG-Vergrößerung bzw. Scherung zu klein war, um einen so großen Prozentsatz an Proteinen zu aggregieren, dass er auch im Monomergehalt als Abnahme aufgefallen wäre. Die Stresserhöhung durch Zunahme der Schüttelgeschwindigkeit wurde nur ersichtlich durch die Zunahme der Trübung und leichte Zunahme der löslichen Aggregate (Abb. 4.3.4).

Betrachtet man die Abb. 4.3.4, so kann man erkennen, dass bei 300 U/min sowohl die nicht-tweenhaltige wie auch die tweenhaltige Lösung leicht an löslichen Aggregaten zunahm. Ansonsten konnte insgesamt ein höherer Gehalt an löslichen Aggregaten in den hochkonzentrierten Lösungen mit Tween, im Gegensatz zu den Lösungen ohne Tween beobachtet werden. Dieser Effekt wurde auch schon im vorhergehenden Versuch beobachtet und diskutiert.

In der visuellen Kontrolle konnte ein Unterschied zwischen den verschiedenen Schüttelgeschwindigkeiten, aber vor allem zwischen den tweenhaltigen und nicht-tweenhaltigen Lösungen gesehen werden (Abb. 4.3.6). Die nicht-tweenhaltigen Lösungen zeigten nach 120 h eine starke Trübung. In den mit 300 U/min geschüttelten Proben war nach 120 h Schaum entstanden, welcher Aggregate enthielt. Schütteln mit 250 U/min erzeugte eine einheitliche Trübung. Proben, die mit 200 U/min geschüttelt wurden, zeigten eine starke Trübung und eine gelartige Ablagerung an der Glaswand. Das Schütteln der tweenhaltigen

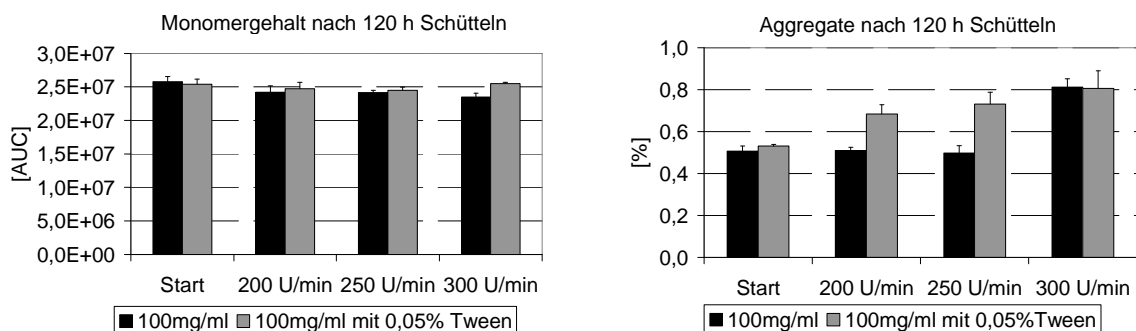


Abbildung 4.3.4 SEC-Ergebnisse: Monomergehalt (links) und lösliche Aggregate (rechts) von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 100 mg/ml nach 120 h Schütteln mit 200, 250 und 300 U/min (1 ml Füllmenge, 2 ml-Vial, RT)

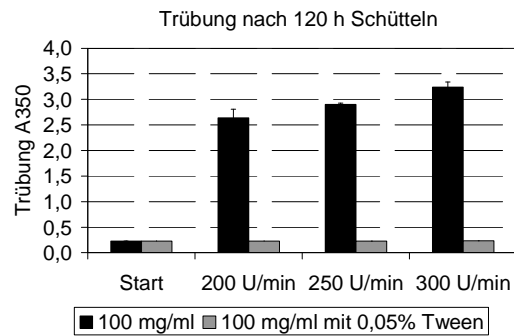


Abbildung 4.3.5 UV/VIS-spektroskopische Trübungsmessung von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 100 mg/ml mit und ohne Tween nach 120 h Schütteln mit 200, 250 und 300 U/min (1 ml Füllmenge, 2 ml-Vial, RT)

Proben ergab opaleszente Lösungen, die nach Schütteln mit 300 U/min etwas stärker opaleszent schienen. Eine Stabilisierung durch Tween konnte also auch hier wieder beobachtet werden.

Die Bildung von aggregathaltigem Schaum in den mit 300 U/min geschüttelten Proben kann mittels Mikroskopaufnahmen erklärt werden. Hier war zu erkennen, dass die Aggregate sich an kleine Luftblasen anhefteten und deshalb aufschwammen (Abb. 4.3.6). Durch das Erhöhen der Schüttelgeschwindigkeit wurde der Lufteinschluss in der Lösung erhöht. Da sich die Proteine mit ihren hydrophoben Gruppen an die Luft anlagern und aggregieren, schwimmen sie bei Schaumentstehung auf (selbiges konnte im 6 ml-Vial in Kapitel 4.1.2.2 gesehen werden; siehe auch Hochgeschwindigkeitsaufnahmen im Anhang A3, Tab A.3.3). Mehr Luft in der Lösung bedeutet auch, dass sich die kleinen Aggregate zu größeren Zusammenschlüssen zusammenlagern. Dies ist in Abb. 4.3.6 mit Schüttelintensitätserhöhung in den mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen. Auch der Rührstress mit Luft führte zu ähnlichen Bildern (Kapitel 4.1.1.6), während er ohne Luft keine größeren Aggregatzusammenschlüsse ergab (Kapitel 4.2.2).

Abschließend lässt sich sagen, dass dieser Versuch zeigte, dass hohe Konzentrationen selbst bei einer Schüttelintensitätserhöhung auf den Monomergehalt bezogen eine Stabilisierung hervorriefen. Jedoch wurde in der Trübungsmessung mit zunehmender Schüttelintensität eine zunehmende Trübung beobachtet, die visuell und mikroskopisch bestätigt werden konnte.

Aus diesem Grund sind solche Lösungen trotz hohen Monomergehaltes nicht einsetzbar. Die Zugabe von Tween konnte die Trübung und somit die Bildung unlöslicher Aggregate erheblich reduzieren. Verglichen mit Kapitel 4.1.2 kann eine Kombination von Konzentrationserhöhung und Tweenzugabe das Cetuximab also gegen Schüttelstress stabilisieren.

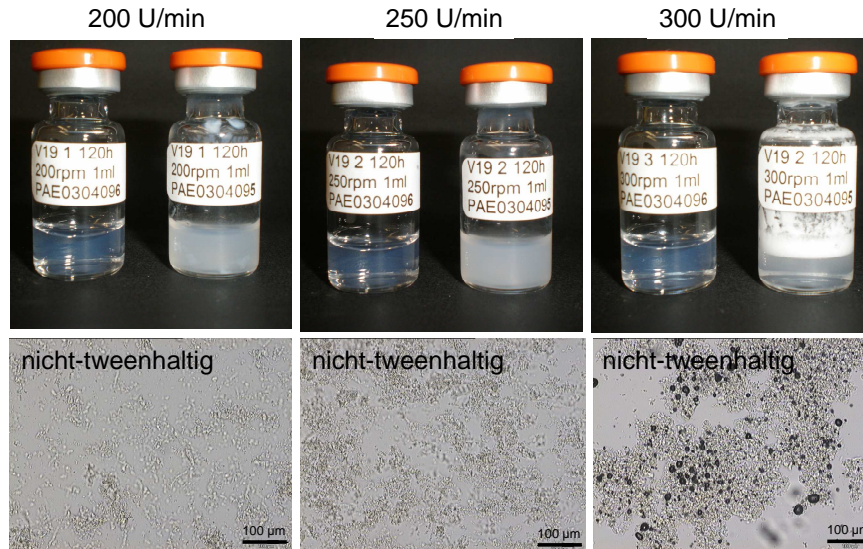


Abbildung 4.3.6 Oben: visuelle Kontrolle nach 120 h von mit verschiedenen Schüttelintensitäten geschüttelten Proben: links im Bild tweenhaltige Cetuximab-Lösung mit 100 mg/ml, rechts im Bild nicht-tweenhaltige Cetuximab-Lösung mit 100 mg/ml; unten mikroskopische Aufnahmen der nicht-tweenhaltigen Lösungen nach 120 h bei verschiedenen Schüttelintensitäten

4.3.1.3 Zusammenfassende Diskussion

Allgemein betrachtet, ist das Bestimmen von Instabilitäten in hochkonzentrierten Lösungen nicht ganz einfach, da die meisten analytischen Methoden nur an gering konzentrierten Proben durchgeführt werden können, was eine Verdünnung der hochkonzentrierten Proben voraussetzt. Durch Verdünnen, wie z.B. in der SEC, können unter Umständen Protein-Protein-Interaktionen nicht mehr detektiert oder Aggregate wieder aufgelöst werden [Shire et al. 2004].

Die hier erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Erhöhung der Proteinkonzentration eine Stabilisierung gegen physikalischen Stress bewirken kann [Sluzky et al. 1991]. Bei Wärmestress kann eine Konzentrationserhöhung aber auch einen gegenteiligen Effekt haben [Treuheit et al. 2002]. Wie oben schon besprochen gibt es die Hypothese [Treuheit et al. 2002], dass sich in einer hochkonzentrierten Lösung prozentual weniger Proteine an der Grenzfläche befinden und sich aus diesem Grund beim Schütteln auch weniger Proteine partiell entfalten bzw. miteinander aggregieren. Der geringe Monomergehaltsverlust der hochkonzentrierten Lösungen kann darüber erklärt werden. Allerdings konnte auch eine Trübungszunahme, die fast genauso stark war wie in den gering konzentrierten Lösungen beobachtet werden. Das spricht dafür, dass, absolut betrachtet, fast dieselbe Proteinmenge aggregierte.

Ein weiterer Grund für die hohe Stabilität der hochkonzentrierten Lösungen nach Schütteln könnte auch in der erhöhten Viskosität liegen (siehe Tab. 3.1.1). Es ist nämlich bekannt, dass

hochkonzentrierte Antikörperlösungen eine deutlich erhöhte Viskosität aufweisen (100 mg/ml ca. 5 mPas, Tab. 3.1.1) [Kanai et al. 2008; Liu et al. 2005; Saluja et al. 2006; Saluja und Kalonia 2008]. Dadurch ergeben sich andere Strömungseigenschaften (siehe Kapitel 4.2.1) und aus diesem Grund auch andere Luft-Wasser-Grenzflächen. Da außerdem bekannt ist, dass sich mit steigender Konzentration eines Proteins die Oberflächenspannung ändert [Mahler et al. 2009], entstehen auch dadurch veränderte Benetzungseigenschaften der Flüssigkeit auf der Glasoberfläche des Vials und wiederum eine andere Luft-Wasser-Grenzfläche. Dies könnten zusätzliche Gründe sein, warum die in Kapitel 4.1.2 präsentierte diskriminierende Bedingung für hochkonzentrierte Lösung nicht mehr diskriminierend ist, da auch ein anderer Stress entstanden ist

Eine weitere Fragestellung am Anfang dieses Kapitels war, ob Tween innerhalb hochkonzentrierter Lösungen auch einen stabilisierenden Effekt beim Schütteln hat. Dieser stabilisierende Effekt konnte sowohl bei der 5 mg/ml Lösung als auch bei der 100 mg/ml Cetuximab-Lösung beobachtet werden. Tween stabilisiert auch unterhalb der CMC [Chou et al. 2005; Mahler et al. 2009]. Da sich die in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration sogar erheblich oberhalb der CMC befand (0,05 %), konnte eine Stabilisierung in diesem Fall trotz hoher Proteinkonzentration auch erwartet werden [Nerurka et al. 1997].

Interessant ist außerdem, dass sich in den hochkonzentrierten tweenhaltigen Lösungen lösliche Aggregate bildeten. Auch beim Schütteln mit gering konzentrierten tweenhaltigen Lösungen (Kapitel 4.1.2.4) konnte bei einem zu starken Stress zunächst vorwiegend ein Anstieg an löslichen Aggregaten entdeckt werden. Anscheinend verhindert Tween, dass sich direkt größere Aggregate bilden. Dies könnte an der vollständigen Besetzung der LWG mit Tween liegen.

4.3.2 Statistische Versuchsplanung für verschiedene Konzentrationen beim Schütteln

In dem vorliegenden Kapitel sollen die Schüttelversuche aus Kapitel 4.1.2 (niedrigkonzentrierte Proteinlösungen) und 4.3.1 (hochkonzentrierte Proteinlösungen) kombiniert anhand eines Experimentes mit statistischer Versuchsplanung beurteilt werden. Statistisches Versuchsdesign oder auch „Design of experiments (DoE)“ wird seit vielen Jahren für unterschiedliche Versuchsansätze verwendet [Klous et al. 2004; Oberg und Vitek 2009; Ogungbenro et al. 2009; Tye 2004] und wurde erstmals 1936 [Fisher 1936] beschrieben. Es geht in der statistischen Versuchsplanung darum, Versuche mit mehreren Parametern systematisch unter bestimmten, aus der Statistik abgeleiteten Bedingungen, auszuführen. Der Fokus der hier vorgestellten Experimente lag auf Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Einflussgrößen, die mit der Versuchs-Methode „One factor at a time (Ein-Faktor-Experiment)“ nicht sichtbar gemacht werden konnten. „One factor at a time“ bedeutet, es wird nur ein Parameter, wie z.B. die Konzentration, anhand einer Versuchsreihe untersucht. Die anderen Parameter, wie z.B. Füllmenge oder Schüttelgeschwindigkeit, bleiben hierbei zunächst unverändert [Singh et al. 2005b]. Nach diesem Prinzip wurden die in der vorliegenden Arbeit bisher präsentierten Daten erhoben. Aber ob und wie die unterschiedlichen Parameter sich gegenseitig beeinflussen, konnte damit nicht festgestellt werden. Aus diesem Grund sollen in diesem Kapitel die untersuchten Parameter (Einflussgrößen), die einen Einfluss auf das Ergebnis gezeigt haben, wie Füllmenge, Schüttelintensität, Konzentration des Antikörpers, die Schüttelzeit, aber auch der Zusatz von Tween, statistisch untersucht werden. Dabei ist das Ziel, mit möglichst wenigen Versuchen eine systematische Untersuchung der Zusammenhänge zwischen diesen Einflussgrößen und den Zielgrößen (Monomergehalt, Trübungswerte, löslicher Aggregatgehalt) zu schaffen. Eine weitere Fragestellung war außerdem, ob eine Kombination an Parametern gefunden werden kann, bei welcher der größte bzw. der geringste Stress für das Protein auftritt, also ein Optimum.

4.3.2.1 Aufstellung eines Versuchsplans

Um die statistische Berechnung nur in dem Bereich, der praktisch von Interesse ist, durchzuführen, mussten zunächst Grenzen festgelegt werden, die den Versuchsraum abstecken. Diese Randbedingungen sind in Tabelle 4.3.1 dargestellt.

Tabelle 4.3.1 Grenzen und Funktionen für den Versuchsplan des Schüttelversuches mit PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung in 2 ml-Vials

Parameter	von	bis	Eingegebene Funktionen (Zusatzinformationen)
Konzentration	1 mg/ml	100 mg/ml	3 Punkte im Raum (quadratische Funktion)
Füllmenge	0,5 ml	3 ml	4 Punkte im Raum (kubische Funktion) auf Grund von Vorversuchen
Schüttelintensität	150 U/min	300 U/min	4 Punkte im Raum (kubische Funktion) auf Grund von Praktikabilität (2 Versuche mit 2 Schüttlern)
Schüttelzeit	0 h	120 h	3 Punkte im Raum (quadratische Funktion)
Tween 80	0%	0,05%	2 Punkte im Raum (diskrete Größe) Verhalten mit und ohne Tween untersucht

Der Versuchsplan wurde mit dem kommerziellen Programm Cornerstone[®] aufgestellt. Die in Tab. 4.3.1 angegebenen Randbedingungen wurden dem Programm vorgegeben. Dann musste entschieden werden, welches Versuchsdesign verwendet werden soll. Es gibt grundsätzlich in der statistischen Versuchsplanung verschiedene Versuchsdesigns, die unterschiedlich viele Versuche beinhalten [Petersen 1991]. Die vollfaktoriellen Versuchspläne untersuchen jeden Parameter in Kombination mit jedem anderen, was eine sehr große Anzahl von Versuchen erfordert. Ein teilfaktorieller Versuchsplan steckt die Ecken des Versuchsraumes ab und benötigt deshalb wesentlich weniger Versuche. Das Programm Cornerstone[®] kann nach Eingabe der Randbedingungen selbst berechnen, mit welchem Versuchsdesign die geringste Anzahl von Versuchen, aber das größtmögliche Wissen, erzielt werden kann. In dem vorliegenden Versuch wurde ein D-optimaler Versuchsplan von Cornerstone[®] vorgeschlagen und gewählt [Cornerstone[®] Handbücher 2003]. D-optimale Pläne sind meist die flexibelsten unter allen Versuchsplanungstypen und bieten die Möglichkeit, unter gegebenen Randbedingungen per Algorithmus diejenigen Versuche auszuwählen, die am besten zur Schätzung des Modells beitragen [Petersen 1991; Wember 2009]. Ein weiterer Vorteil von D-optimalen Versuchsplänen ist, dass Bereiche, die nicht von Bedeutung sind, aus der Berechnung herausgelassen werden. Die Punkte werden so im Versuchsraum verteilt, dass möglichst viel Volumen überstrichen wird. Bei Modellen mit quadratischen Effekten führt dieses Konstruktionsprinzip dazu, dass die Punkte in die Mitte und an die Enden des Versuchsgebietes gelegt werden (3 Punkte im Raum). Bei Modellen höherer Ordnung werden zusätzliche Zwischenpunkte erzeugt (kubisch = 4 Punkte im Raum). Der D-optimale Algorithmus erfordert eine große Rechenleistung, da iterativ gerechnet wird, und kann nicht

mehr manuell berechnet werden, vor allem wenn viele Parameter/ Faktoren gewählt werden. Es ist wichtig, Erkenntnisse aus Vorversuchen bezüglich zu erwartender Kurvenverläufe, wie auch Reproduzierbarkeiten und Fehler in die Überlegungen mit einzubeziehen [Selwyn 1996]. Nur dann können im Versuchsplan genügend Punkte/ Versuche eingeplant werden, um später eine entsprechende Funktion überhaupt fitten zu können. Aus diesem Grund wurde z.B. die Füllmenge mit einer kubischen Funktion in Cornerstone[®] eingegeben (Tab. 4.3.1), da man hier in Vorversuchen (Kapitel 4.1.2) eine Instabilitätsabnahme sowohl mit höheren wie auch mit geringeren Füllmengen erkennen konnte. Diese Funktionen können in D-optimale Versuchspläne integriert werden. Außerdem wurde in diesem Fall Tween als diskrete Größe eingegeben, so dass nur Versuche mit 0,05% Tween oder 0 % Tween resultierten (Tab. 4.3.1). Schließlich berechnete Cornerstone[®] zunächst den unter Material und Methoden aufgeführten Versuchsplan (Tab. 3.1.4).

Die in dem Versuchsplan angegebenen Versuche wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Als Zielgröße wurden Monomergehalt, Trübungswerte und lösliche Aggregate detektiert (Anhang A7, Tab. A.7). Da aber von diesen Größen nur die absolute Monomergehaltsabnahme (per SEC) die Instabilitäten in ihrer Gesamtheit zusammenfassen kann, soll in dem vorliegenden Kapitel der Einfachheit halber nur das Ergebnis des Monomergehaltes besprochen werden. Natürlich sollte im Anschluss auch die Trübung in Bezug auf ein errechnetes Optimum betrachtet werden, da eine trübe Lösung trotz eines geringen Monomergehaltsverlustes nicht zugelassen werden kann.

4.3.2.2 Auswertung mit Hilfe von „Cornerstone[®]“

Nach der Durchführung der Versuche wurde der für die verschiedenen Parameterkombinationen detektierte Monomergehalt jeweils in Cornerstone[®] eingegeben (Anhang A7, Tab. A.7). Anhand einer Regressionsanalyse konnten dann die Zusammenhänge der einzelnen Parameter durch Cornerstone[®] berechnet werden [Scheffler 1997]. Der Term, der den Berechnungen zugrunde lag und Konstante, lineare Haupteffekte, Wechselwirkungen, quadratische Effekte wie auch Fehler enthielt, ist unter Material und Methoden beschrieben. Zunächst musste das Modell angepasst werden. Dies wurde mit einer schrittweisen Regression gemacht. Ausgangspunkt ist das Anfangsmodell. Die Anpassung erfolgt schrittweise durch Hinzunahme signifikanter Terme. Dabei muss eine Term-Hierarchie befolgt werden (z.B. lineare Terme vor quadratischen).

Regression	
File Options Graphs Summaries Optimization Enhanced CS Menu Help	
Variables...	
Subset...	
Auto	
Suggest	
In/Out	
Delete	
Cross	
Add Terms...	
Outliers	
All In	
Term Significance	
Term	Monomer [AUC]
Konzentration [mg/ml] * Füllmenge [ml]	0.0162884 1 df In
Füllmenge [ml] * Zeit [h]	0.153861 1 df Out
Füllmenge [ml] * Schüttelintensität [U/min]	0.0546890 1 df In
Füllmenge [ml] * Tween 80 [%]	0.0971182 1 df In
Konzentration [mg/ml]^2	0.00869440 1 df In
Konzentration [mg/ml] * Zeit [h]	0.00414794 1 df In
Konzentration [mg/ml] * Schüttelintensität [U/min]	0.0113644 1 df In
Konzentration [mg/ml] * Tween 80 [%]	0.000158095 1 df In
Zeit [h]^2	0.846101 1 df Out
Schüttelintensität [U/min] * Zeit [h]	0.227580 1 df Out
Zeit [h] * Tween 80 [%]	0.139487 1 df Out
Schüttelintensität [U/min]^2	0.115941 1 df Out
Schüttelintensität [U/min] * Tween 80 [%]	0.0984506 1 df In
R-Square	0.7420
Adj R-Square	0.646222
RMS Error	3041205.343
Residual df	35
Status: Fitted Model.	

Abbildung 4.3.7: Ausschnitt aus dem Fenster der Regressionsanalyse mittels Cornerstone® mit den errechneten Angaben R^2 , adj. R^2 , RMS Error und Freiheitsgraden (df)

Die Signifikanzniveaus sind einstellbar, in diesem Versuch wurden eine 5% Hürde für die Hinzunahme und eine 10% Hürde für den Ausschluss gewählt (Voreinstellung Cornerstone®).

Mit der Automatik-Einstellung von Cornerstone[®] konnte die Regression nach diesem Prinzip erhalten werden (Abb. 4.3.7). Nach Überprüfung dieses Modells (z.B. ob die Reststreuung der Zielgröße aus einer normalverteilten Grundgesamtheit besteht, die Einflussgrößen sich nicht gegenseitig bedingen und es keine Ausreißer mit Hebelwirkungen gibt) mittels verschiedener Funktionen von Cornerstone[®], wurde die Auswertung durchgeführt.

Wie in Abb. 4.3.7 zu erkennen ist, wurde nur ein R^2 von 0,742 erreicht. Dies bedeutet, dass nur 74 % der Punkte mit diesem Modell erklärt werden können. Das R^2 hat die Eigenschaft, dass es umso größer wird, je größer die Zahl der unabhängigen Variablen ist. Dies geschieht unabhängig davon, ob weitere unabhängige Variablen wirklich einen Beitrag zur Erklärungskraft liefern. Daher sollte das adj. R^2 berücksichtigt werden. Das adj. R^2 balanciert die Erklärungskraft des Modells (R^2) mit der Komplexität des Modells repräsentiert durch die Anzahl der unabhängigen Variablen aus. Je komplexer das Modell ist, desto mehr "bestraft" R^2 jede neu hinzugenommene unabhängige Variable. In dem vorliegenden Fall konnten also anscheinend nur 64 % (adj. R^2) anstelle 74 % (R^2) der Punkte durch das vorliegende Modell erklärt werden (Abb. 4.3.7). Eigentlich sollten R^2 und adjustiertes R^2 nahe beieinander liegen (< 10% Abweichung), was in dem vorliegenden Beispiel nicht der Fall ist. Dies kann auf ein „Overfitting“ hindeuten, was bedeutet, dass zu viele erklärende Variablen das Modell beschreiben. Der RMS Error (Root Mean Square) gibt den Schätzwert für die Standardabweichung an und wird in derselben Einheit wie die Zielgröße angegeben. Da hier die AUC des Monomergehaltes gemessen wurden, beläuft er sich auf ca. 3 Mio, was recht viel ist. Außerdem sind die Freiheitsgrade (Residuals df) des vorliegenden Modells angegeben, die in diesem Fall 35 sind.

Nach der Durchführung der Regression wurden zunächst die Wechselwirkungen betrachtet. Sie sind in Abb. 4.3.8 in Form eines Matrixgraphen mit allen Paaren der Faktoren dargestellt. Wechselwirkungen sind an nicht parallel verlaufenden Kurven zu erkennen.

Es konnten Wechselwirkungen zwischen den Paaren Füllvolumen/ Schüttelintensität, Füllvolumen/ Tween, Schüttelintensität/ Tween so wie für alle Parameter in Kombination mit der Konzentration ermittelt werden. Eine Erklärung für die Wechselwirkungen in Kombination mit der Konzentration könnte folgende sein: Da eine Konzentrationserhöhung auf den Monomergehalt bezogen sehr stabilisierend wirkt (Monomergehaltsabnahmen fallen prozentual gesehen bei hohen Konzentrationen kaum ins Gewicht), können Unterschiede in Füllmenge oder Schüttelintensität nicht mehr gesehen werden. Dieses erschwert darüber hinaus auch, eine diskriminierende Bedingung mit denselben Parametern für alle Konzentrationen zu finden (siehe Kapitel 4.3.1).

Außerdem zeigen Füllmenge und Schüttelintensität zueinander Wechselwirkungen, was schon unter 4.2.1 gesehen wurde, da bei verschiedenen Geschwindigkeiten und verschiedenen Füllmengen verschiedene Luft-Wasser-Grenzflächen entstehen. Aus diesem Grund ist auch eine Wechselwirkung zwischen Tween und der Füllmenge und Tween und der Geschwindigkeit zu sehen, da Tween an dieser Luft-Wasser-Grenzfläche seine Wirkung zeigt [Katakam et al. 1995; Patapoff und Esue 2009] und durch seine Oberflächenaktivität auch das Strömungsverhalten bzw. die Luft-Wasser-Grenzfläche beeinflussen kann.

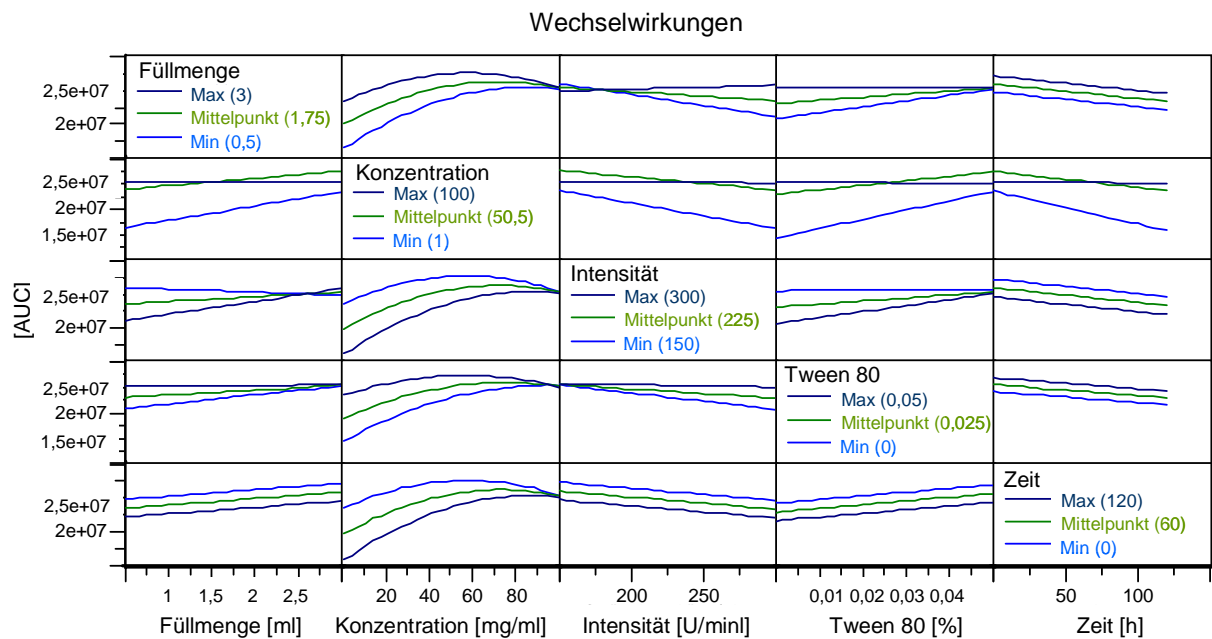


Abbildung 4.3.8: Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Parametern erkennbar durch nicht parallel verlaufende Kurven der verschiedenen Niveaus; 3 verschiedene Niveaus (Maximum, Mittelwert, Minimum) sind dargestellt

Anhand des berechneten Modells konnten nun auch Vorhersagen getroffen werden, wie sich der Monomergehalt in dem betrachteten Raum verändert, wenn die Parameter verändert werden. Dies ist in Abb. 4.3.9 dargestellt. Hier sind als blaue Kurven die Vertrauensbereiche (auch Konfidenzintervalle genannt) dargestellt. Ein Konfidenzintervall gibt eine Wahrscheinlichkeit an, mit der der Mittelwert in einem genannten Bereich liegt, z.B. 95%ige Wahrscheinlichkeit. Links ist der zu erwartende Monomergehalt bei gegebener Parametereinstellung als AUC, ebenfalls mit dem zu erwartenden +/- Vertrauensbereich angegeben. Ändert man die Parameter, ändern sich auch die vorhergesagten Kurven, da die Parameter teilweise untereinander Wechselwirkungen zeigten. In Grafik A ist die Parameterkombination der diskriminierenden Bedingung aus Kap. 4.1.2 (Konz. 5 mg/ml; Füllmenge 1 ml; Schüttelgeschwindigkeit 200 U/min; Zeit 120 h, ohne Zusatz von Tween)

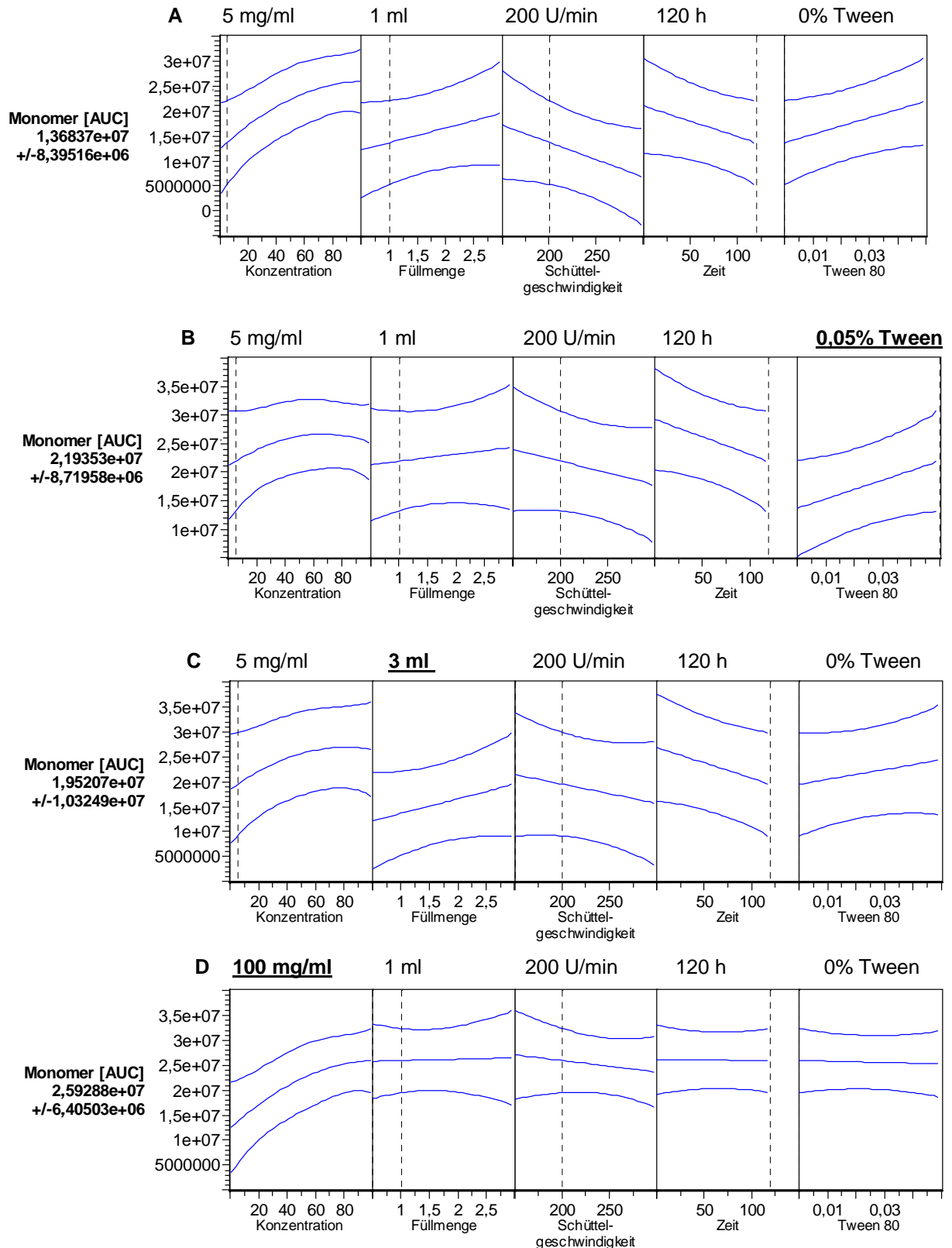


Abbildung 4.3.9: Mittels Cornerstone® berechnete Kurvenverläufe des Monomergehaltes mit 95%-Vertrauensbereichen (blaue Kurven); A-D: Kombination verschiedener Parameter (oben jeweils angegeben; in Diagramm gestrichelte Linien); links: zu erwartender Monomergehalt bei gegebener Parametereinstellung mit +/- Angabe des Vertrauensbereiches

anhand gestrichelter Linien dargestellt. Die zu erwartende AUC beträgt bei dieser Einstellung ca. 13,6 Mio Flächeneinheiten im Mittel. Mit Steigerung der Schüttelintensität wie auch Steigerung der Schütteldauer ist die Tendenz zu geringeren Monomergehalten in den Kurven vorhergesagt.

Diese Annahme konnte durch andere Versuche auch bestätigt werden (Kapitel 4.1.2). Anhand der Kurven erkennt man auch, dass mit steigender Konzentration nach Vorhersage der Monomergehalt zunehmen sollte, was für eine Stabilisierung der höheren Konzentrationen bei gegebenen Bedingungen spricht (siehe auch Kapitel 4.3.1). Diese Vorhersage ist bei Erhöhung der Konzentration in Abb 4.3.9 D auch tatsächlich eingetroffen, denn bei gegebener Einstellung erhöhte sich der zu erwartende Monomergehalt auf ca. 25,9 Mio. Flächeneinheiten im Mittel. Alle Kurven für Füllmenge, Schüttelintensität, Zeit wie auch Tween verliefen hier nahezu ohne Steigung, so dass daraus geschlossen werden konnte, dass bei einer Konzentration von 100 mg/ml die Lösung so stabil war, dass die anderen Stress-Parameter fast keinen Einfluss mehr auf den Monomergehalt hatten. Genau dieses Phänomen konnte in Kapitel 4.3.1 nach Schütteln der 100 mg/ml Cetuximab-Lösungen auch gesehen werden.

Die Vorhersagen zeigen alle sehr breite Vertrauensbereiche an. Ein sehr breiter Vertrauensbereich weist auf einen zu geringen Stichprobenumfang hin, oder darauf, dass das zu untersuchende Phänomen so variabel ist, dass nur ein unrealistisch großer Stichprobenumfang einen aussagekräftigen Vertrauensbereich schaffen würde. Aus diesem Grund sind die zuvor diskutierten Argumente nur als Tendenzen oder Vermutungen zu verstehen, da sie statistisch nicht bewiesen sind. Dennoch sollte dieser hier gewählte Ansatz nicht unbesprochen bleiben. Er soll aufzeigen, dass zu erwartende Effekte mittels statistischen Versuchsdesigns bei sehr breiten Variationen (z.B. bedingt durch die Analysenmethoden) nicht oder nur mit Hilfe eines sehr großen Stichprobenumfangs gesehen werden können.

Auch Widersprüche zu Laborergebnissen können auftreten. Z.B. sollte der Monomergehalt mit steigender Füllmenge zunehmen (Abb. 4.3.9 C). Dies widerspricht den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.2 für Füllmengen kleiner 1 ml, allerdings wurde dort nur mit 5 mg/ml gearbeitet. Unter Berücksichtigung von Konzentrationen bis 100 mg/ml können sich in dem vorliegenden Versuch andere Kurvenverläufe ergeben, so dass in diesem Fall bei Füllmengen kleiner 1 ml eine Destabilisierung stattfinden könnte [Kiese et al. 2008]. Aber für Füllmengen größer 1 ml stimmen die Vorhersagen mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.2 überein. Auch nicht überraschend war die Vorhersage der Tendenz des steigenden Monomergehaltes bei steigender Tweenzugabe, auch wenn sie nicht statistisch bewiesen war (Abb. 4.3.9 B).

4.3.2.3 Zusammenfassende Diskussion

Zusammenfassend könnte also eine Konzentrationserhöhung zu einer Stabilisierung des Antikörpers in Bezug auf die Monomergehalte führen. Diese Aussage ist in Übereinstimmung mit vorhergehenden Versuchen (Kap 4.3.1). Weiterhin konnte die Vermutung einer leichten stabilisierenden Tendenz durch Erhöhung der Tweenkonzentration und der Füllmenge aufgestellt werden. Allerdings lagen die Werte innerhalb des Vertrauensbereiches. Dadurch ist dieses Statistische Versuchsdesign nur bedingt aussagekräftig.

Es konnten jedoch Wechselwirkungen detektiert werden. Die Wechselwirkung zwischen Füllmenge und Schüttelintensität war z.B. ein interessanter Hinweis, da diese möglicherweise auf eine Veränderung der Luft-Wasser-Grenzfläche zurückgeführt werden kann. Die Konzentration zeigte mit allen anderen Parametern Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen sind auf den stark stabilisierenden Effekt der Konzentration auf den Monomergehalt zurückzuführen, so dass andere Effekte wie Füllmengen und Schüttelintensität daneben nicht mehr gesehen werden konnten.

Doch abgesehen davon gibt es ein weiteres Ergebnis, welches das Modell und das hier gezeigte statistische Versuchsdesign für Antikörper sehr fragwürdig erscheinen lässt: Das Optimum, bei dem der höchste Monomergehalt nach Cornerstone® detektiert werden sollte (Abb. 4.3.10) liegt bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 202 U/min und nicht etwa bei der langsameren von 150 U/min. Außerdem führt ein Tweengehalt von nur 0,009% zu dem höchsten Monomergehalt. Auch 77 h Schütteln scheint nach diesem Modell den höchsten Monomergehalt hervorzubringen, also höher als ein nur kurzes oder gar kein Schütteln. Dass diese Ergebnisse fehlerhaft sein müssen, ist leicht zu erkennen. Aus diesem Grund sollte man dem hier dargestellten Versuch mit Vorsicht begegnen. Die Berechnung des Optimums scheint jedenfalls fehlgeschlagen zu sein.

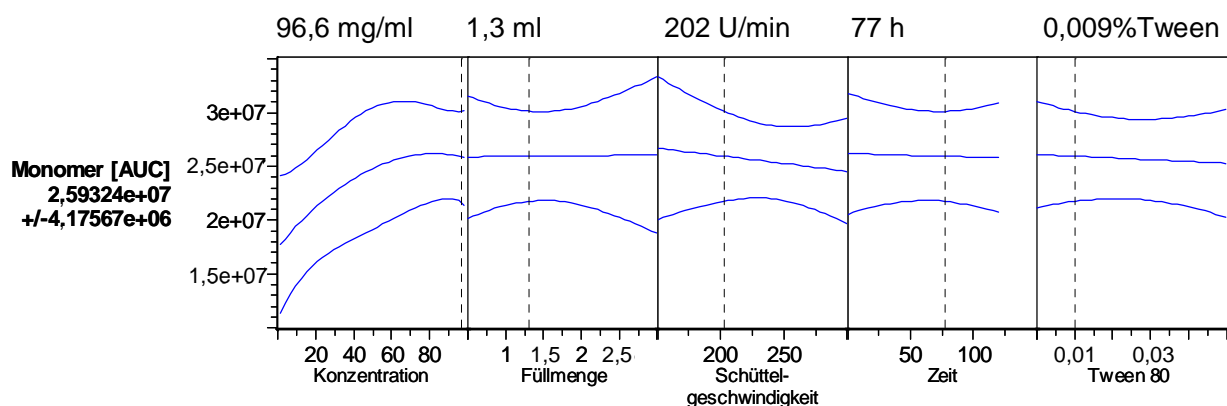


Abbildung 4.3.10: Von Cornerstone® vorgegebenes Optimum für höchsten Monomergehalt

Gründe für das fehlerhafte Modell bzw. die nicht erklärbaren Optimum-Ergebnisse könnten sein, wie auch schon in Kap. 4.3.1 gesehen, dass der Monomergehalt der hochkonzentrierten Lösungen in der SEC nicht detektierbar abnimmt und der Fehler (bzw. der Vertrauensbereich) in diesem Fall größer ist als der durch Parameteränderung zu beobachtende Effekt. Hinzu kommt, dass das Programm sehr viele Punkte auf die Startwerte legte, die sich kaum voneinander unterschieden. Möglicherweise hätte ein vollfaktorieller Versuchsplan oder weniger Punkte am Start (ungeschüttelt) und dafür mehr Punkte nach verschiedenen Stresszeiten mehr Aufschluss über die Wechselwirkungen und ein „richtigeres“ Optimum hervorgebracht. Außerdem wurde in 4.3.1 auch gezeigt, dass Antikörper-Lösungen mit einem hohen Monomergehalt auch stark trüb sein können und einen nicht unbedeutenden Anteil an unlöslichen Aggregaten enthalten können. Unter diesem Aspekt sollten immer Ergebnisse verschiedener analytischer Methoden berücksichtigt werden [Philo 2006; Wang 1999]. Entsprechende Versuche wurden zwar auch mit Cornerstone[®] durchgeführt (Daten nicht gezeigt), aber diese Ergebnisse waren ebenfalls nicht sehr aufschlussreich. Da sie immer nur große oder kleine Aggregate darstellten, war ein Gesamtzusammenhang schwer zu erkennen. Statistisches Versuchsdesign ist prinzipiell eine gute Methode, um mit wenig Versuchen eine breite Information über die Prozessparameter zu erhalten. Z.B. wird das statistische Versuchsdesign im „drug delivery“ [Kamila et al. 2009; Motwani et al. 2008; Singh et al. 2005b; Singh et al. 2005a] häufig eingesetzt. Allerdings muss gewährleistet sein, dass Fehler, bedingt durch die Analysenmethode, nicht größer sind als die zu erwartenden Effekte und eine Reproduzierbarkeit der Versuche gegeben ist.

In dem hier vorliegenden Fall konnten zwar keine eindeutigen Ergebnisse mittels statistischer Versuchsplanung generiert werden (R^2 von nur 0,74), und das Modell konnte nicht alle Ergebnisse erklären. Es konnten jedoch einige der in den vorangegangenen Untersuchungen gefundenen Effekte durch Wechselwirkungen oder gesehenen Tendenzen hier bestätigt werden, wie z.B. der stabilisierende Einfluss der Konzentration.

4.3.3. Aufkonzentrierungstechniken für hochkonzentrierte Antikörperlösungen im Vergleich

Wie in Kapitel 4.3.1 gezeigt wurde, sind hochkonzentrierte Antikörperlösungen gegen mechanischen Stress wie Schütteln stabiler als gering konzentrierte Lösungen [Treuheit et al. 2002]. Um die Antikörper in die stabilere hochkonzentrierte Form zu bringen, müssen sie allerdings zunächst aufkonzentriert werden. Die Aufkonzentrierung selbst, die mittels Tangentialstromfiltration (TFF), Filtration mittels Zentrifugalkonzentratoren oder Rührzelle oder mittels Dialyse durchgeführt werden kann [Phillips und Signs 2004], stellt ebenfalls einen mechanischen Stress für die Proteine dar. Dies ist z.B. an den leicht erhöhten Werten für lösliche Aggregate in den hochkonzentrierten gegenüber den 5 mg/ml-Antikörperlösungen zu erkennen (Kap. 4.3.1). Dieser mechanische Stress sollte sich, wie auch der Schüttelstress, in physikalischen Instabilitäten wie Aggregation äußern [Saluja und Kalonia 2008]. Im Folgenden sollen Untersuchungen zur Stabilität und Qualität von Cetuximab nach Konzentrierung durch die vier genannten Techniken vorgestellt werden.

Hierbei war es Ziel, eine „small scale“ Technik zu finden, die hinsichtlich Qualität und Stabilität die ähnlichsten Ergebnisse zu der später in der Produktion verwendeten TFF liefert. Außerdem war es von Interesse, mögliche Unterschiede zwischen den Techniken auszumachen und festzustellen, welche Technik das stabilste Produkt liefert. Das Ergebnis der verschiedenen Techniken wurde hinsichtlich auftretender Luft-Wasser-Grenzfläche oder Scherung beurteilt. Außer der Aufkonzentrierungstechnik selbst sind aber auch andere Faktoren, wie das Material der gewählten Membran [Saxena et al. 2009], die Porengröße der Membran oder aber auch die Konzentration, von welcher ausgehend die Aufkonzentrierung gestartet wird, wichtige Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen können. Aus diesem Grund wurden auch diese Parameter untersucht.

4.3.3.1 Verschiedene Membrantypen

Es gibt verschiedene Membrantypen, die für die Aufkonzentrierung von Proteinen genutzt werden [Saxena et al. 2009]. Die hier untersuchten Ultrafiltrationsmembranen bestanden zum einen aus Polyethersulfon (PES) und zum anderen aus regenerierter Zellulose (RC). Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser beiden Membrantypen sind in Abb. 4.3.11 abgebildet. Nach Herstellerangabe (Millipore Corporation Bedford; USA) sind PES-Membranen robuster gegenüber diversen Reinigungslösungen und hohen Flüssen.

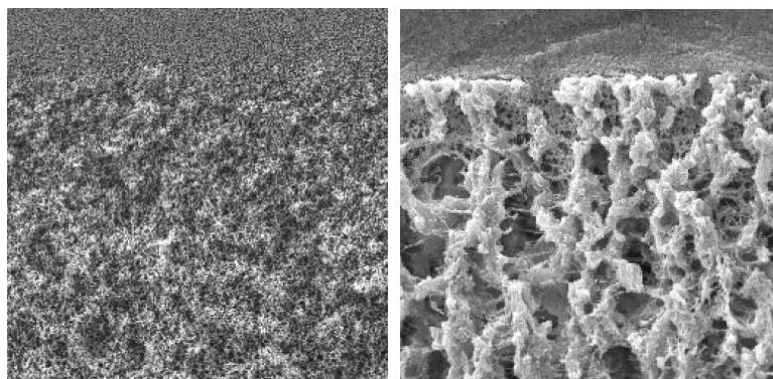


Abbildung 4.3.11 Links Biomax-Membran (Millipore) aus Polyethersulfon (PES); rechts: Ultracell-Membran (Millipore) aus Regenerierter Zellulose (RC) (Bilder aus [Rubin und Christy 2002])

Vorteile der RC-Membranen sind hingegen eine geringere Verblockungsneigung der Membran und eine geringere Proteinbindung.

Um die Fragestellung zu beantworten, welche Membran eine qualitativ hochwertigere Proteinlösung als Endergebnis nach Aufkonzentrierung erzeugen kann, wurde PBS-gepuffertes Cetuximab (2 mg/ml) mittels Rührzelle (Druck 10 Psi/ 0,69 bar, Rührplatte Stufe 2) dreimal mit einer PES-Membran und dreimal mit einer RC-Membran aufkonzentriert.

Mit beiden Membrantypen konnten innerhalb von 45-65 min Konzentrationen von 35-50 mg/ml erreicht werden (Abb. 4.3.12). Die Versuchswiederholungen fielen jedoch recht unterschiedlich aus, so dass kein eindeutiger Unterschied zwischen den Membranen hinsichtlich der Konzentrierungsgeschwindigkeit gefunden werden konnte. Die Reproduzierbarkeit war somit gering.

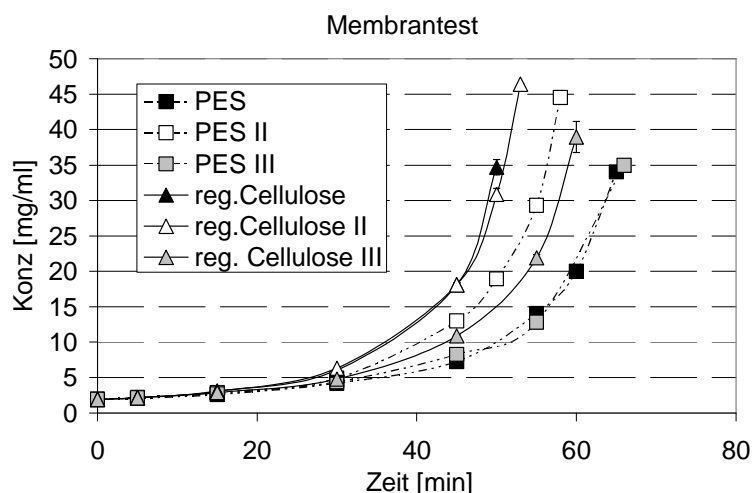


Abbildung 4.3.12 Konzentrations-Zeit-Profile für die Aufkonzentrierung einer 2 mg/ml PBS-gepufferten Cetuximab-Lösung mittels Rührzelle mit PES- bzw. RC-Membran (pro Membran 3 Versuche)

In der zeitabhängigen Trübungsmessung (Werte nicht gezeigt) konnten ebenfalls sehr unterschiedliche Trübungen festgestellt werden (Werte bis 0,5). Außerdem wurde ersichtlich, dass Aggregate entstanden waren. Diese Aggregate wurden auch in der visuellen Kontrolle und unter dem Lichtmikroskop beobachtet (Abb. 4.3.13). Das bedeutet, dass das Aufkonzentrieren mittels Rührzelle und der gewählten Methode anscheinend einen erheblichen Stress für das Cetuximab darstellte.

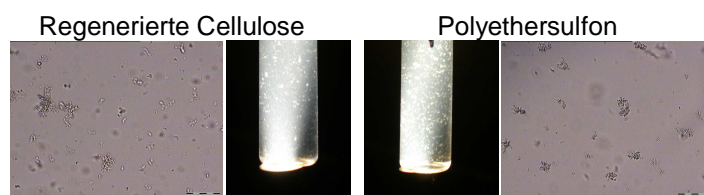


Abbildung 4.3.13 Mikroskopische Aufnahmen und visuelle Kontrolle von mit unterschiedlichen Membranen aufkonzentrierten Lösungen am Endpunkt der Aufkonzentrierung

In der SEC wurde für beide Membrantypen ein leichter Anstieg an löslichen Aggregaten gegenüber dem Startwert beobachtet (Abb. 4.3.14). Auch hier war kein Vorteil einer Membran gegenüber der anderen zu erkennen. Erst im Monomergehalt konnte ein leichter Vorteil der PES-Membran gegenüber der RC-Membran erkannt werden (Abb. 4.3.14). Obwohl unterschiedliche Endkonzentrationen erreicht wurden (Abb. 4.3.12), zeigte die RC-Membran in allen 3 Wiederholungen geringere Monomergehalte als die PES-Membran. Für die SEC-Analyse wurden die Proben am Ende der Aufkonzentrierung alle auf 5 mg/ml verdünnt, so dass die Analyse für alle Versuche bei gleichen Konzentrationen stattfand und ein Vergleich gut möglich war.

Es ist allerdings fraglich, welche Aussagekraft diese Beobachtungen haben, da die gesamte Aufkonzentrierungstechnik sehr schlechte Ergebnisse (Präzipitatbildung) zeigte. Sie erinnert an die Rührversuche (Kapitel 4.1.1; Kapitel 4.2.2). Allerdings wurden in dem vorliegenden Versuch auch lösliche Aggregate detektiert, im Gegensatz zu den klassischen Rührversuchen. Eine Erklärung dafür könnte die ständig ansteigende Konzentration sein. Abschließend kann festgehalten werden, dass mit diesem Versuch ein leicht unterschiedliches Verhalten der beiden Membranen beobachtet werden konnte [Maruyama et al. 2001a].

Die folgenden Versuche wurden alle mit einer RC-Membran durchgeführt, da die zu vergleichende Dialysemembran nur aus regenerierter Zellulose erhältlich war. Nur so war ein Vergleich verschiedener Aufkonzentrierungs-Techniken ohne den Einfluss verschiedener Membranmaterialien möglich.

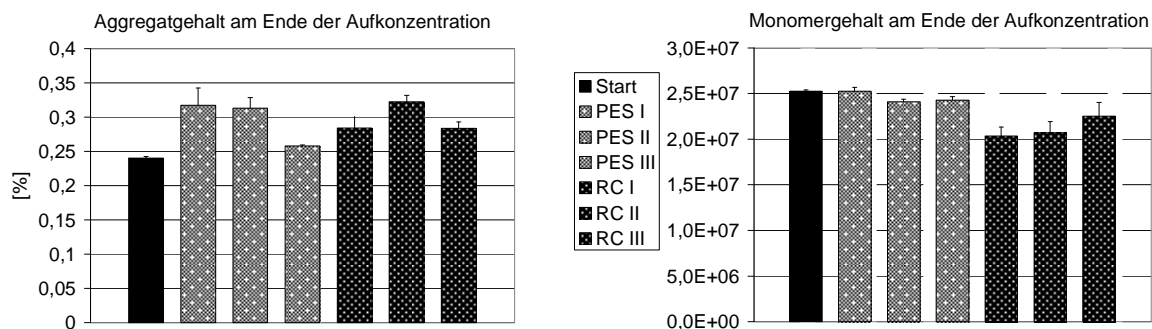


Abbildung 4.3.14 SEC-Ergebnisse (verdünnt auf 5 mg/ml) von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (ausgehend von 2 mg/ml) am Endpunkt der Aufkonzentrierung mittels RC- und PES-Membranen, links: Anteil an löslichen Aggregaten, rechts: Monomergehalt

4.3.3.2 Verschiedene Ausschlussgrenzen

Der Einfluss der Ausschlussgrenze (Cut off) wurde im folgenden Versuch anhand der Aufkonzentrierungsmethode Filtration mittels Zentrifugalkonzentratoren an einer regenerierten Zellulosemembran genauer untersucht. Dazu wurde eine 10 mg/ml PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung verwendet. 15 ml dieser Lösung wurden in Amicon Ultra-15-Zentrifugen-Filtereinheiten (Millipore) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kD, 30 kD und 100 kD gegeben. Für den Versuch wurden pro Ausschlussgrenze drei Zentrifugalkonzentratoren verwendet. Es wurde mit 2000 g zentrifugiert und nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen.

Wie in Abb. 4.3.15 zu sehen ist, waren die Aufkonzentrierungszeiten für alle drei Ausschlussgrenzen annähernd gleich. Die Vermutung lag nahe, dass die Membran mit der größten Porengröße auch die schnellste Aufkonzentrierungszeit hervorbringen würde, allerdings konnte dies hier nicht bestätigt werden. Die Trübung ist in Abb. 4.3.15 gegen die Aufkonzentrierungszeit aufgetragen. Eine höhere Konzentration bewirkt eine zunehmende Opaleszenz und damit eine an sich höhere Trübung [Sukumar et al. 2004]. In dem vorliegenden Fall verliefen die Kurven recht ähnlich und somit war keine Unterscheidung der verschiedenen Ausschlussgrenzen möglich.

Auch visuell und unter dem Mikroskop (Daten nicht dargestellt) konnten keine Unterschiede bezüglich der verschiedenen Ausschlussgrenzen festgestellt werden.

Es wurde auch eine SDS-PAGE durchgeführt, um kovalente Aggregate ausfindig zu machen, aber auch hier konnten keine Unterschiede bezüglich der Porengröße der Membran beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

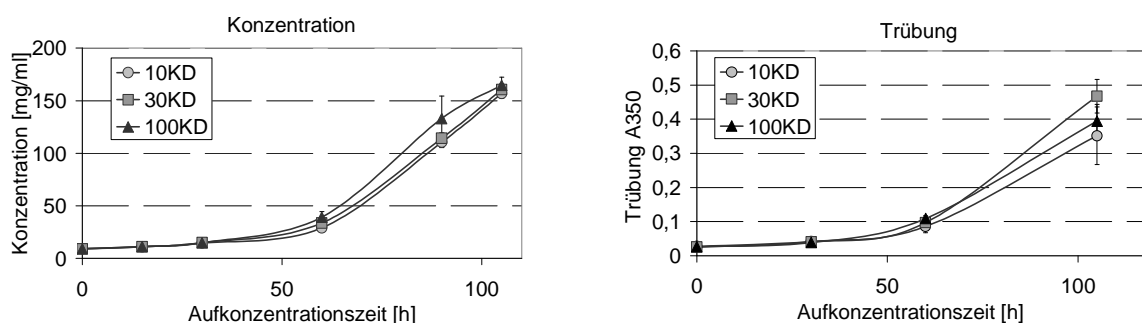


Abbildung 4.3.15: Links: Konzentrations-Zeit-Profile von Cetuximab während der Aufkonzentrierung mittels Zentrifugalkonzentratoren unter Verwendung von Membranen aus RC mit verschiedenen Ausschlussgrenzen; rechts: Trübungsmessung gegen Aufkonzentrierungszeit von Cetuximab während desselben Versuchs

Die Monomergehalte (Abb. 4.3.16 A) zeigten ebenfalls keinen Zusammenhang mit der Ausschlussgrenze und unterschieden sich nicht vom Startwert. Dies bedeutet, dass die Aufkonzentrierungstechnik Zentrifugation einen geringeren Stress auf die Lösung ausübte als die Rührzelle (s.4.3.3.1), denn dort war bei Verwendung der RC-Membran ein Abfall des Monomergehaltes aufgetreten (vgl. Abb. 4.3.14). Außerdem waren die mittels Rührzelle aufkonzentrierten Proben (PES- und RC-Membran) wesentlich trüber und zeigten Präzipitate im Gegensatz zu den Proben, die mittels Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert wurden. Dieser Unterschied könnte mit der Luft-Wasser-Grenzfläche begründet werden, die in den Zentrifugalkonzentratoren kleiner als in der Rührzelle war. Wahrscheinlich war auch die Durchmischung der Lösung in der Rührzelle größer. Wie schon häufiger in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Luft-Wasser-Grenzfläche in Kombination mit dem Durchmischen der Lösung zu Instabilitäten (Kapitel 4.2). Vielleicht war aber auch der Rührvorgang ein stärkerer Scherstress als das Zentrifugieren. Die beobachteten Unterschiede können allerdings auch das Ergebnis verschiedener Startkonzentrationen gewesen sein. Der Versuch bezüglich verschiedener Ausschlussgrenzen wurde nämlich ausgehend von 10 mg/ml im Gegensatz zu dem Membrantyp-Versuch ausgehend von 2 mg/ml durchgeführt. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde in diesem Zusammenhang auch der Einfluss der Startkonzentration untersucht, die Ergebnisse sind unter 4.3.3.3 dargestellt.

Die Konzentration an löslichen Aggregaten (Abb. 4.3.16 B), die mittels SEC detektiert wurde, zeigte eine leichte Erhöhung bei Verwendung der 10 kD und 100 kD Membran. Die 30 kD Membran erzeugte annähernd denselben Aggregationsgehalt wie am Start. Dafür trat bei dieser Membran die stärkste Trübung in der UV/VIS-Spektroskopie auf (Abb. 4.3.15).

Die Degradationsprodukte der Membranen mit kleineren Porengrößen wurden im Retentat zurückgehalten. 100 kD Porengröße schien für manche Degradationsprodukte zu groß zu sein,

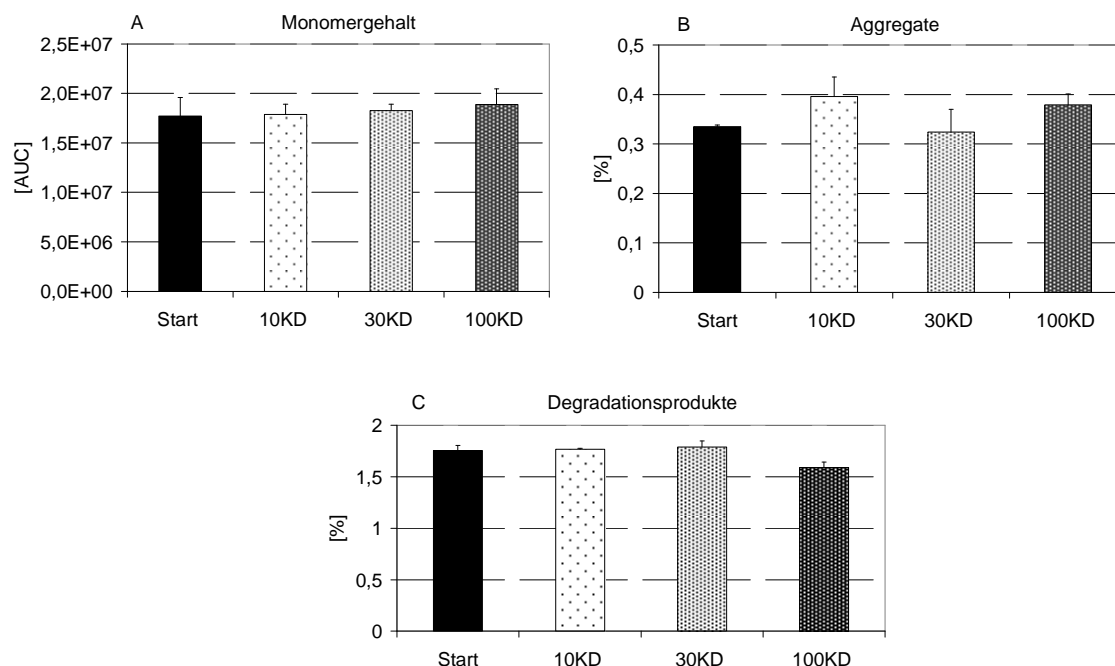


Abbildung 4.3.16: SEC-Ergebnisse (verdünnt auf 5 mg/ml), A: Monomergehalt; B: lösliche Aggregate; C: Degradationsprodukte von Cetuximab nach Aufkonzentrierung mittels Zentrifugalkonzentratoren unter Verwendung von Membranen aus regenerierter Zellulose mit verschiedenen Ausschlussgrenzen

so dass sie im Permeat verloren gingen und daher nicht mehr im Retentat nachweisbar waren (Abb. 4.3.16 C). Der Monomergehalt änderte sich trotz unterschiedlicher Konzentrationen an Aggregaten und Degradationsprodukten nicht, da in hochkonzentrierten Lösungen diese Anteile kaum etwas an dem absoluten Monomergehalt ausmachen (siehe auch Kapitel 4.3.1). Anhand dieser Erkenntnis ist abschließend zu sagen, dass die Porengröße zwar einen nur sehr geringen Einfluss auf die Aufkonzentrierungszeit und Aggregatbildung ausübte, die 100 kD Membran aber nicht empfohlen werden kann, wenn auch Degradationsprodukte ermittelt werden sollen.

4.3.3.3 Verschiedene Startkonzentrationen

Wie im vorherigen Kapitel schon angesprochen, wurden recht unterschiedliche Ergebnisse nach Aufkonzentrierung mittels Rührzelle (Kap. 4.3.3.1) im Vergleich zu den Zentrifugalkonzentratoren (Kap. 4.3.3.2) ermittelt. Da für die beiden Versuche zwei unterschiedliche Startkonzentrationen verwendet wurden, sollte mit folgendem Versuch festgestellt werden, ob die Unterschiede auf Grund der Aufkonzentrierungstechnik oder der Startkonzentration erhalten wurden. Deshalb wurde Cetuximab mit Ausgangskonzentrationen von 10 mg/ml und 2 mg/ml mittels Rührzelle und Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert. Die Versuchsbedingungen wurden wie in den Versuchen zuvor gewählt, die

Aufkonzentrierung wurde beendet, als das Retentat das kleinst mögliche Volumen der Aufkonzentrierungstechnik erreicht hatte (Zentrifugalkonzentratoren ca. 0,3-0,4 ml, Rührzelle ca. 2-2,5 ml).

In Abb. 4.3.17 sind die mikroskopischen Bilder nach Aufkonzentrierung am Endpunkt der Aufkonzentrierung dargestellt. Das Konzentrat aus der Rührzelle zeigte mehr Aggregate als das aus den Zentrifugalkonzentratoren. Dabei führte die Startkonzentration von 10 mg/ml zu weniger Aggregaten unter dem Mikroskop als 2 mg/ml. Genau dasselbe Erscheinungsbild bot sich in der visuellen Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Die großen Aggregate in der 2 mg/ml Lösung nach Aufkonzentrierung mittels Rührzelle waren auch visuell sehr deutlich zu erkennen (siehe auch Abb. 4.3.13).

Dieser Trend setzte sich in der Trübungsmessung fort (Abb. 4.3.18). Lösungen aus der Rührzelle hatten hier bei gleicher Konzentration wesentlich höhere Trübungswerte als die Proben aus den Zentrifugalkonzentratoren. Im Vergleich der Startkonzentrationen zeigten sowohl nach Verwendung der Rührzelle als auch nach Verwendung der Zentrifugalkonzentratoren die Kurven der 2 mg/ml-Lösung höhere Steigungen und höhere Trübungswerte als die zu vergleichenden 10 mg/ml-Werte.

Was die Aufkonzentrierungszeiten der 10 mg/ml-Startkonzentrationen anbelangt, konnten in derselben Zeitspanne mittels Zentrifugalkonzentrator höhere Konzentrationen erreicht werden als mittels Rührzelle (Abb. 4.3.18). Die 2 mg/ml-Startkonzentrationen betrachtend, konnten mittels Rührzelle nur ca. 30 mg/ml erreicht werden, wohingegen mittels Zentrifugalkonzentratoren eine Konzentration von ca. 60 mg/ml erreicht wurde. Interessant

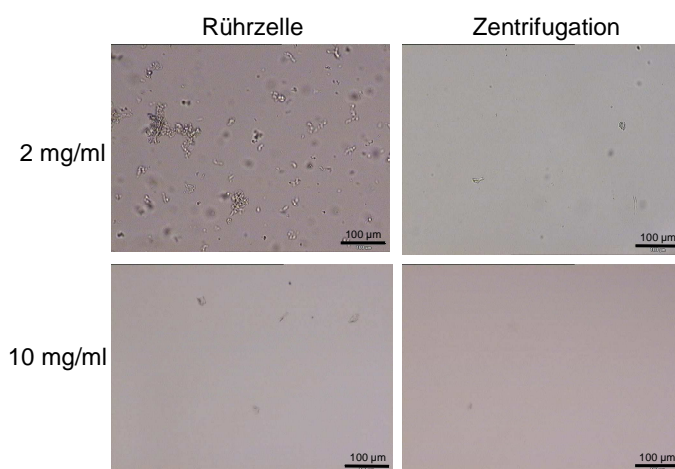


Abbildung 4.3.17: Mikroskopische Aufnahmen von Cetuximab aufkonzentriert mittels Rührzelle oder Zentrifugalkonzentratoren ausgehend von unterschiedlichen Startkonzentrationen am Endpunkt der Aufkonzentrierung

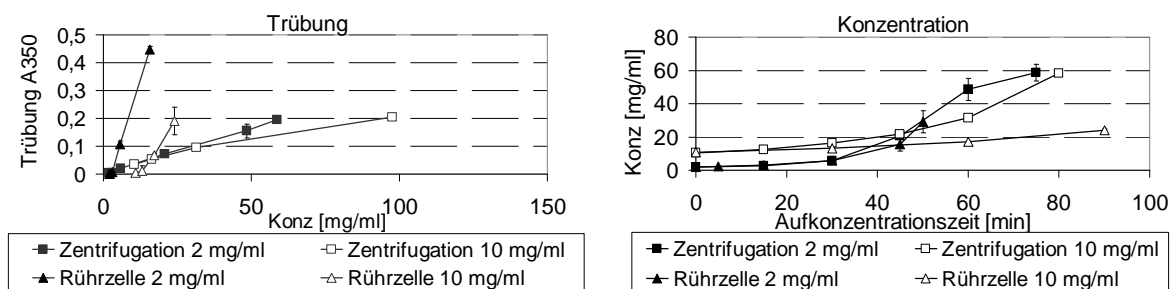


Abbildung 4.3.18 Aufkonzentrierung von Cetuximab mittels Rührzelle und Zentrifugalkonzentrator ausgehend von unterschiedlichen Startkonzentrationen (2 mg/ml oder 10 mg/ml), links: Trübung mittels UV/VIS-Spektroskopie gegen die Konzentration; rechts: Konzentration gegen Aufkonzentrationszeit

war, dass nach ca. 45 min der Unterschied der Startkonzentrationen mit beiden Techniken ausgeglichen war und eine Konzentration von ca. 15-20 mg/ml resultierte. Das lag wahrscheinlich daran, dass eine geringere Startkonzentration aufgrund der geringeren Viskosität zunächst schnellere Filtrierflüsse bewirkte. In der höher konzentrierten Lösung resultierten im Gegensatz dazu langsamere Filtrationszeiten. In Abb. 4.3.18 scheint es so, als ob die Filtrationsrate ansteigt. Das kann damit erklärt werden, dass bei höheren Konzentrationen auch ein sehr geringes Filtratvolumen ausreicht, um die Konzentration stark ansteigen zu lassen. Somit nahm zwar das Filtratvolumen im Laufe der Konzentrationszeit ab, aber die Konzentration selbst stieg erheblich an.

Die SEC-Ergebnisse (Proben wurde alle am Ende der Aufkonzentrierung auf 5 mg/ml verdünnt) (Abb. 4.3.19) sind gegensätzlich zu den bisher diskutierten Daten. Der Monomergehalt, der mittels Rührzelle erreicht wurde, zeigte zwar mit beiden Startkonzentrationen geringere Werte als der mittels Zentrifugalkonzentrator erreichte. Jedoch ist der Monomergehalt am Ende der Aufkonzentrierung, der mittels Zentrifugalkonzentrator erreicht wurde, bei Verwendung einer Startkonzentration von 2 mg/ml höher als bei Verwendung der 10 mg/ml-Lösung. Nach Benutzung der Rührzelle wurden gleiche Monomergehaltsabfälle detektiert, unabhängig davon, welche Startkonzentration verwendet wurde.

Der Anteil löslicher Aggregate war nach Aufkonzentrierung der 10 mg/ml Cetuximab-Lösung mittels Rührzelle erhöht. In den Monomergehalten resultierten aber für beide Startkonzentrationen dieselben Monomergehaltsabfälle. In der 2 mg/ml Lösung scheinen also eher große Aggregate, die mittels Mikroskop und Trübungsmessung detektiert wurden, in der

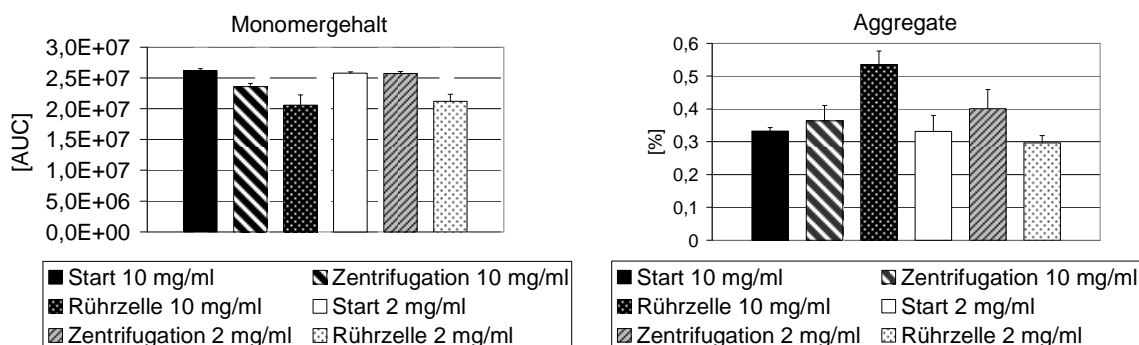


Abbildung 4.3.19 Aufkonzentrierung von Cetuximab mittels Rührzelle und Zentrifugalkonzentrator ausgehend von unterschiedlichen Startkonzentrationen (2 mg/ml oder 10 mg/ml), SEC-Ergebnisse (verdünnt auf 5 mg/ml), links: Monomergehalte, rechts: lösliche Aggregate

10 mg/ml Lösung anscheinend mehr kleine Aggregate, die mittels SEC detektiert wurden, entstanden zu sein. Die löslichen Aggregate, die mittels Zentrifugalkonzentratoren nach Aufkonzentrierung erhalten wurden, unterschieden sich unabhängig von der Startkonzentration kaum von den löslichen Aggregaten, die auch schon am Start vorhanden waren.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Startkonzentration einen Einfluss auf die Qualität des erhaltenden Produktes hat. Geringer konzentrierte Lösungen, wie auch in Kapitel 4.3.1 zu sehen war, zeigen nach Aufkonzentrierung stärkere Trübungswerte, enthielten also wahrscheinlich mehr unlösliche Aggregate [Sluzky et al. 1991; Treuheit et al. 2002].

Es konnte mit den hier vorgelegten Versuchen gezeigt werden, dass die Startkonzentration, der Membrantyp, aber auch die Ausschlussgrenze Faktoren sind, die das Endergebnis beeinflussen können. Allerdings ist die Entwicklung optimierter Aufkonzentrierungsprotokolle sehr aufwendig, wie in der Literatur schon gezeigt wurde [Rosenberg et al. 2009], und sollte nicht Bestandteil der vorliegenden Versuche sein.

Der Vergleich von Rührzelle und Zentrifugalkonzentratoren zeigte, dass neben der Startkonzentration auch die Aufkonzentrierungstechnik selbst erhebliche Unterschiede bezüglich der Qualität des aufkonzentrierten Proteins bewirken kann. Dass Rühren einen großen Stress für Cetuximab darstellt, konnte in Kapitel 4.1 schon gezeigt werden und wurde in dem vorliegenden Versuch erneut bestätigt, auch wenn die Versuchsparameter etwas anders waren. Die Zentrifugation schien mit den hier gewählten Parametern in diesem Fall die mildere Aufkonzentrierungsmethode gewesen zu sein.

4.3.3.4 Machbarkeits-Studie für verschiedene Aufkonzentrierungstechniken

In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, wie sich die vier verschiedenen Aufkonzentrierungstechniken Tangentialstromfiltration (TFF), Zentrifugalkonzentratoren, Dialyse und Rührzelle voneinander unterscheiden. Die Versuche mit jeder dieser Aufkonzentrierungstechniken wurden dafür ausgehend von einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml dreimal wiederholt. Das Ergebnis wurde hinsichtlich verwendeter Proteinmenge, erreichbarer Konzentration, benötigter Zeit zum Aufkonzentrieren, Handhabung und Qualität des aufkonzentrierten Antikörpers ausgewertet (Anhang A8, Tab. A.8). Es sollte möglichst eine Zielkonzentration von 100 mg/ml erreicht werden. Außerdem wurde ein Vergleich der drei „small scale“-Techniken Zentrifugalkonzentratoren, Dialyse und Rührzelle zu der im Großmaßstab durchführbaren und in der Produktion verwendeten TFF gezogen [Saxena et al. 2009]. Um in der Formulierungsentwicklung geeignete Formulierungen zu entwickeln, sollte der Stress beim Aufkonzentrieren mit wenig Proteinmenge mit dem späteren Stress der TFF vergleichbar sein.

In Abb. 4.3.20 ist das Konzentrations-Zeit-Profil für die verschiedenen Techniken dargestellt. In der Grafik ist zu erkennen, dass die TFF die kürzeste Zeit zum Erreichen höherer Konzentrationen benötigte. Jedoch ist dies auch von den verwendeten Parametern abhängig (z.B. TMP = 1,5 bar). In diesem Fall wurden für die einzelnen Techniken Parameterkombinationen verwendet, die erfahrungsgemäß gute Ergebnisse lieferten. Auffällig ist, dass die Dialyse eine sehr lange Zeit benötigte, um die gewünschte Konzentration von 100 mg/ml zu erreichen. Außerdem trat in der dreifachen Wiederholung ein Ausreißer auf, der auf ein Loch in der Membran zurückzuführen sein könnte. Die Zentrifugation konnte unter den Bedingungen dieser Studie die höchsten Konzentrationen (bis zu 170 mg/ml) hervorbringen. Mit einer TFF könnten derartige Konzentrationen auch erreicht werden, denn eine Volumenbegrenzung nach oben ist hier nicht gegeben. In dieser „small scale“-Studie diente die TFF allerdings nur als Vergleich zu den anderen Methoden. Mit 200 ml Startvolumen war sie hier die Technik mit dem höchsten Ausgangsvolumen. Der Zentrifugalkonzentrator benötigte im Gegensatz dazu nur 15 ml (10 mg/ml) und es konnte damit annähernd dieselben Endkonzentrationen erreicht werden, nur mit einem geringeren Volumen. Im Vergleich dazu startete die Rührzelle mit 50 ml Ausgangsvolumen und erreichte nur eine Endkonzentration von 150 mg/ml. Die Dialyse startete mit 30 ml Startvolumen, was immer noch der doppelte Wert der Zentrifugalkonzentratoren darstellt, und erreichte auch nur eine Endkonzentration von 170 mg/ml. Für jede Technik wurde bis zu einem noch

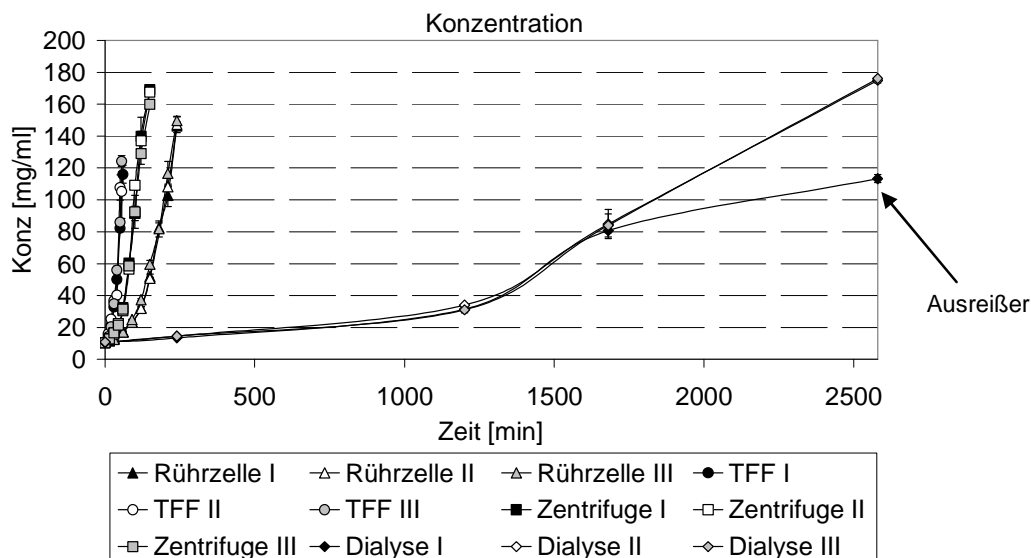


Abbildung 4.3.20 Konzentrations-Zeit-Profil von den vier verschiedenen Aufkonzentrierungstechniken ausgehend von PBS-gepuffertem Cetuximab mit 10 mg/ml

praktikablen Minimalvolumen aufkonzentriert (Anhang A8, Tab. A.8). 200 µl war das geringste Endvolumen, das benötigt wurde, um die nachfolgende Analytik noch durchführen zu können. Für manche Aufkonzentrierungstechniken mussten allerdings größere Endvolumen berücksichtigt werden (TFF 12 - 14 ml; Rührzelle 2 - 2,5 ml; Zentrifugalkonzentrator 0,3 - 0,4 ml; Dialyse 0,2 - 0,3 ml). Ein Proteinverlust durch ein Anheften des Proteins an Membranen oder Wänden des Aufkonzentrierungsobjektes musste ebenfalls bedacht werden. „Small scale“-Techniken sind in ihrem Volumen begrenzt, so dass immer nur um einen bestimmten Faktor aufkonzentriert (siehe Anhang A8, Tab. A.8) und nur ein bestimmtes Endvolumen erreicht werden kann. So konnten die verwendeten Dialysekammern, die Zentrifugenröhrchen und die Rührzelle keine höheren Konzentrationen als die in Abb. 4.3.20 dargestellten erreichen, wenn nicht neue Proteinlösung nachgefüllt werden sollte.

Es wurde auch die Qualität der entstandenen aufkonzentrierten Antikörper-Lösungen untersucht. In Abb. 4.3.21 sind die Trübungswerte gegen die Konzentrationen aufgetragen. Da, wie oben schon erläutert, die Trübung auch auf Grund der Konzentration zunimmt, konnte so am besten ein Vergleich gezogen werden. Bei gleicher Konzentration von z.B. 100 mg/ml ist zu erkennen, dass die Zentrifugalkonzentratoren gefolgt von der TFF die geringsten Trübungswerte und die beste Reproduzierbarkeit lieferten. Die Dialyse zeigte die schlechteste Reproduzierbarkeit, denn die drei Wiederholungen wiesen sehr unterschiedliche Trübungen auf. Auch die Rührzelle zeigte eine schlechte Reproduzierbarkeit und hohe

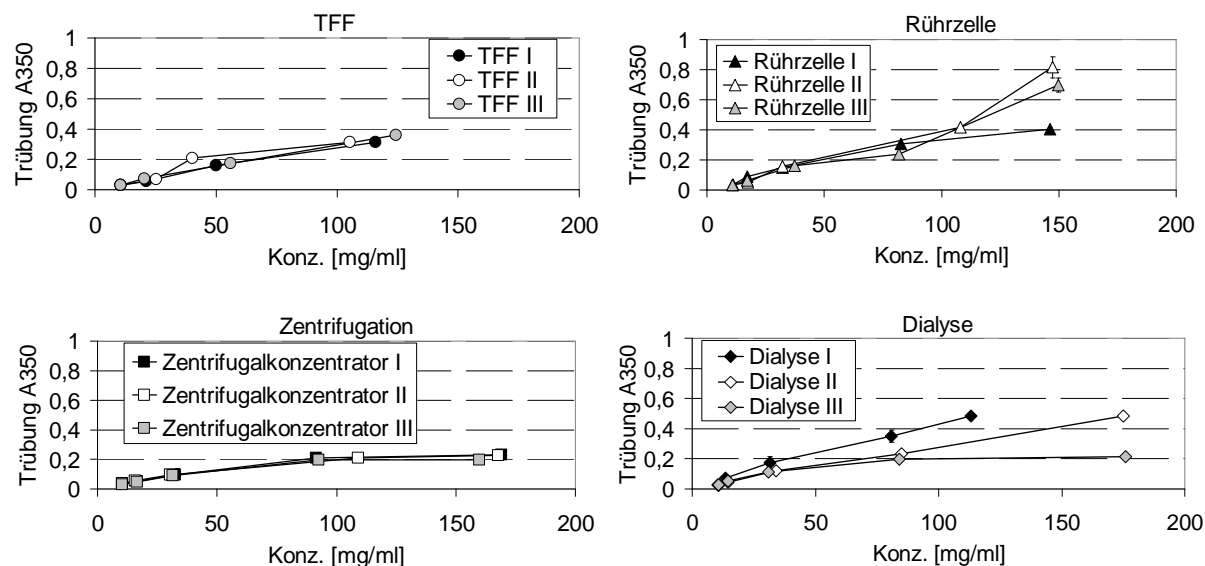


Abbildung 4.3.21 Aufkonzentrierung von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (Startkonzentration 10 mg/ml) mit unterschiedlichen Techniken (je 3 Wiederholungen): Trübungen (UV/VIS-Spektroskopie) aufgetragen gegen die Konzentration

Trübungswerte, wie in den Versuchen zuvor auch schon beobachtet werden konnte (Kap. 4.3.3.3). Die hohen Trübungen nach Verwendung der Dialyse könnten eventuell von dem hyperosmotischen Pulver, welches sich außerhalb der Membran befand, herrühren. Dieses Pulver adsorbierte sehr schnell an festen Gegenständen, so auch an der Kanüle, über welche die Lösung aus der Kassette entnommen wurde. Die Handhabung der Dialyse war, verglichen mit den anderen Aufkonzentrierungstechniken, die komplizierteste, da das Pulver außerhalb der Membran bei einer Probenentnahme schwierig zu fixieren war.

In der visuellen und mikroskopischen Kontrolle (Daten nicht dargestellt) konnten keine Unterschiede bezüglich der Aufkonzentrierungstechnik festgestellt werden. Nur die Viskosität stieg wie auch in den anderen Versuchen an.

Mittels SEC konnte ein Monomergehaltsabfall für alle Aufkonzentrierungstechniken im Vergleich zum Startwert vor der Aufkonzentrierung detektiert werden (Abb. 4.3.22). Der schwächste Abfall wurde nach Aufkonzentrierung mittels Zentrifugalkonzentratoren ermittelt. Die Standardabweichungen waren zum Teil sehr hoch, vor allem nach Nutzung der Dialyse, so dass kein Ranking der Aufkonzentrierungstechniken hinsichtlich Monomergehaltsabfalls vorgenommen werden konnte.

Betrachtet man allerdings die löslichen Aggregate (Abb. 4.3.22), ist eine deutliche Erhöhung derselben bei Nutzung der Rührzelle festzustellen. Die Dialyse zeigte die größten Standardabweichungen. Hier waren also sehr unterschiedliche Proben (große Anzahl vs. geringe Anzahl an löslichen Aggregaten) gemessen worden.

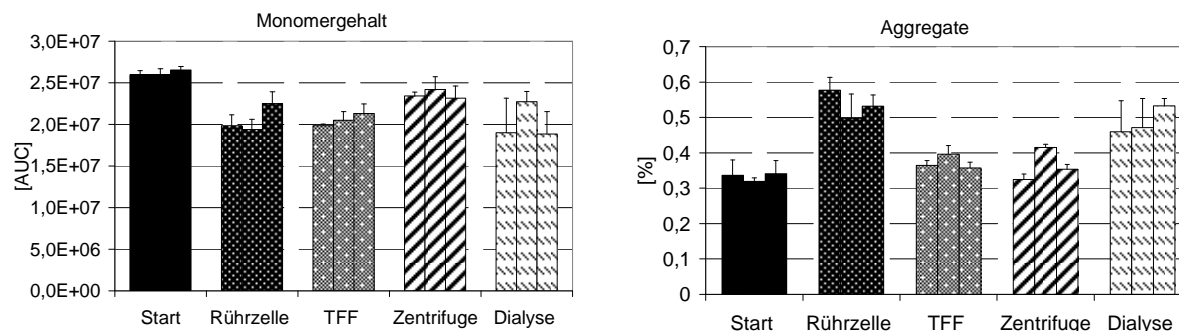


Abbildung 4.3.22 SEC-Ergebnisse von Cetuximab nach Aufkonzentrierung (Endkonzentrationen für Analyse auf 5 mg/ml verdünnt) mit unterschiedlichen Techniken im Vergleich zu den Startwerten vor Aufkonzentrierung (PBS; 10 mg/ml), links: absoluter Monomergehalt; rechts: lösliche Aggregate

In der SDS-PAGE, sowohl im reduzierten wie auch im nicht reduzierten Gel, konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Techniken ausgemacht werden, was dafür sprach, dass keine kovalent gebundenen Aggregate entstanden waren (Daten nicht dargestellt).

Zusammenfassend lässt sich aus der Machbarkeitsstudie festhalten, dass alle vier verwendeten Aufkonzentrierungstechniken eine Konzentration von 100 mg/ml und mehr erreichen konnten. Die benötigte Zeit, um diese Konzentrationen zu erhalten, war für alle Techniken ähnlich (1 - 4 h), abgesehen von der Dialyse, die ein Vielfaches (43 h) länger benötigte (Anhang A8, Tab. A.8). Die Zentrifugalkonzentratoren konnten die geringsten Proteinmengen verarbeiten und auch in der Handhabung erwies sich die Verwendung von Zentrifugalkonzentratoren als die einfachste Methode. Die Zentrifugalkonzentratoren zeigten weiterhin die beste Reproduzierbarkeit und erzeugten nur einen geringen Gehalt an Aggregaten. Die Rührzelle hingegen löste eine erhebliche Aggregatbildung, detektierbar in der Trübungsmessung und SEC, aus. Dies kann, wie oben schon diskutiert, daran liegen, dass diese Technik die größte Luft-Wasser-Grenzfläche während der Aufkonzentrierung im Vergleich zu den anderen Techniken generierte und zudem einen Rührstress ausübte. In der TFF oder Dialyse kam die Antikörper-Lösung kaum mit Luft in Berührung. Während der Zentrifugation war zwar ebenfalls eine Luft-Wasser-Grenzfläche vorhanden, aber diese war recht klein und wurde nicht, wie in der Rührzelle, durch einen Mischvorgang ständig erneuert. Nach dieser Machbarkeitsstudie schien die Zentrifugation die beste Technik im Vergleich zu der TFF zu sein.

4.3.3.5 Stabilitäts-Studie für verschiedene Aufkonzentrierungstechniken

Im nachfolgend dargestellten Versuch sollte genauer auf die Qualität und Stabilität der Cetuximab-Lösungen nach Aufkonzentrierung mittels der verschiedenen Techniken eingegangen werden. In der Machbarkeitsstudie konnten zwar schon leichte

Qualitätsunterschiede festgestellt werden, jedoch wurden hier Lösungen mit unterschiedlichen Endkonzentrationen verglichen. Eine unterschiedlich hohe Konzentration, auch wenn sie für die verschiedenen analytischen Methoden auf Einheitskonzentrationen verdünnt wurde [Harn et al. 2007; Shire et al. 2004], kann trotzdem einen unterschiedlichen Stress für den Antikörper bewirken, welcher sich in der Qualität äußern kann. Aus diesem Grund sind die im Folgenden dargestellten Ergebnisse nur mit 100 mg/ml-Proben ermittelt worden. Da aus der Machbarkeitsstudie hervorging, nach welcher Aufkonzentrierungszeit eine Zielkonzentration von 100 mg/ml mit den verschiedenen Techniken erreicht wurde, konnte der Aufkonzentrierungsversuch für jede Technik nach dieser Zeit abgebrochen werden. Die Lösungen wurden danach auf genau 100 mg/ml eingestellt, steril filtriert und nach aseptischem Abfüllen direkt untersucht. Außerdem wurden je drei Vials pro Aufkonzentrierungstechnik mit 0,7 ml Lösung in 2 ml-Vials bei 25°C und 40°C für 8 Wochen eingelagert.

Da innerhalb hochkonzentrierter Lösungen (wie in Kap 4.3.1 und 4.3.2 gesehen) physikalischer Stress wie Schüttelstress nur eine schwache Stress-Wirkung hat, wurde in diesem Fall nun der chemische Stress einbezogen, indem bei verschiedenen Temperaturen eingelagert wurde. Die Frage war, inwieweit sich die verschiedenen Aufkonzentrierungstechniken auf die Stabilität des Antikörpers auswirken.

Die Ergebnisse zeigen, dass direkt nach der Aufkonzentrierung und nach Filtrieren für alle vier Techniken dieselben Trübungswerte gemessen wurden (Abb. 4.3.23). Diese Werte unterscheiden sich auf Grund des Filtrierens von jenen in der Machbarkeitsstudie. Auch nach der 25°C Einlagerung sind die Trübungswerte für die verschiedenen Techniken annähernd gleich, allerdings kann ein deutlicher Unterschied nach 40°C Einlagerung erkannt werden. Die Dialyse zeigte hier wesentlich geringere Trübungswerte als die anderen Methoden. Interessant ist ebenfalls, dass nur ein leichter Trübungsanstieg nach der Einlagerung bei 25°C im Vergleich zum Start detektiert werden konnte, aber eine sich fast verdoppelnde Trübung verglichen mit den Startwerten nach Einlagerung bei 40°C zu sehen war. Die Einlagerung bei 40°C scheint ein erheblicher chemischer Stress für den nur gepufferten Antikörper bei einer Konzentration von 100 mg/ml zu sein. Wäre hier eine ausgereifte Formulierung verwendet worden, hätte der Antikörper wahrscheinlich bei 40°C weniger Instabilitäten gezeigt, allerdings hätten dann die verschiedenen Techniken nicht mehr so gut miteinander verglichen werden können.

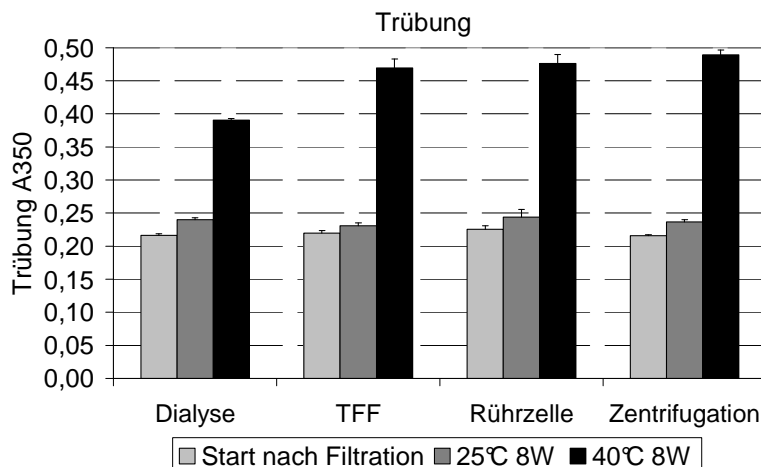


Abbildung 4.3.23 Trübungsmessung (UV/VIS-Spektroskopie) von Cetuximab-Proben mit einer Konzentration von 100 mg/ml nach Aufkonzentrierung am Start und nach Einlagerung bei 25°C und 40°C

Visuell konnte dieser Trend nicht nachvollzogen werden, da es sich nur um Opaleszenzen handelte, und auch unter dem Mikroskop konnten keine größeren Aggregate nach den Einlagerungen nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

Die SEC-Ergebnisse zeigen, dass die Dialyse einen etwas geringeren Monomergehaltsabfall nach Einlagerung bei 25°C und 40°C aufwies als die anderen drei Techniken (Abb. 4.3.24). Die Startwerte direkt nach der Aufkonzentrierung ergaben annähernd dieselben Monomergehalte, wenn die Techniken miteinander verglichen werden. Auch die Ergebnisse nach Einlagerung bei 25 °C zeigten annähernd dieselben Werte für alle Techniken. Insgesamt konnte ein Abfall der Monomere durch die Einlagerung bei 25°C im Vergleich zum Start beobachtet werden, welcher sich noch verstärkte nach Lagerung bei 40°C.

Die Darstellung des Anteils löslicher Aggregate (Abb. 4.3.24) ergibt ein ähnliches Bild wie die der Trübungswerte. Es konnte ein Anstieg des Aggregat-Anteils mit steigender Stresstemperatur erkannt werden. Die Dialyse zeigte sowohl nach Einlagerung bei 25°C als auch bei 40°C eine geringere Menge an löslichen Aggregaten als die anderen Techniken. Abbildung 4.3.24 betrachtend, ist der Anteil löslicher Aggregate nach Einlagerung bei 40°C für die meisten Techniken um das 3-4 fache angestiegen, verglichen mit den 25°C Einlagerungswerten. Dies ist ein Unterschied zu den bisher beobachteten physikalischen Instabilitäten. Denn dort konnten meist direkt größere Aggregate detektiert werden, wenn kein Tween in der Lösung vorhanden war.

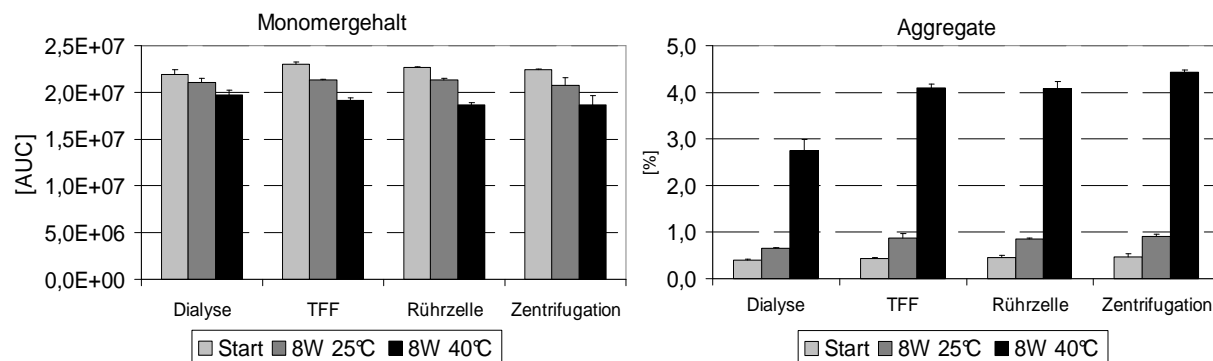


Abbildung 4.3.24 SEC-Ergebnisse von Cetuximab-Proben mit einer Konzentration von 100 mg/ml nach Aufkonzentrierung am Start und nach Einlagerung bei 25°C und 40°C; links: absoluter Monomergehalt; rechts: lösliche Aggregate

Interessanterweise konnte der Trend, dass die Proben, die mittels Dialyse aufkonzentriert wurden, weniger Aggregate enthalten, nicht per Lichtblockade bestätigt werden. In der Lichtblockade wurde zwar die ca. 10fache Partikelanzahl nach Einlagerung bei 40°C im Vergleich zur Einlagerung bei 25°C detektiert, aber kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufkonzentrierungstechniken. Unabhängig davon, mit welcher Technik die Lösung aufkonzentriert wurde, ergaben sich sehr viele 2-3 µm große Partikel und weniger größere Partikel (Anhang A2, Abb. A.2).

Mittels SDS-PAGE kann überprüft werden, ob kovalent gebundene Aggregate entstanden sind, die wesentlich häufiger bei chemischen Instabilitäten vorkommen als bei den bisher untersuchten physikalischen Instabilitäten. Wie in Abb. 4.3.25 zu erkennen ist, konnte in der nicht reduzierten SDS-PAGE keine eindeutige Unterscheidung zwischen den verschiedenen Techniken getroffen werden, abgesehen von der Dialyse. Allgemein ist zu erkennen, dass der Monomergehalt mit steigender Temperatur abnimmt, was bedeutet, dass immer mehr kovalente Aggregate oder Degradationsprodukte bei steigender Temperatur detektiert wurden. Die reduzierte SDS-PAGE zeigt, ob diese kovalenten Aggregate durch das Reduktionsmittel DTT (Dithiotreitol) aufgebrochen werden können oder nicht. Dies betrifft häufig Disulfidbrücken. Hier schien ein Unterschied zwischen der Dialyse und den anderen Aufkonzentrierungstechniken zu bestehen. Die Dialyse zeigte sowohl für die schwere wie für die leichte Kette einen höheren Gehalt, vor allem nach Einlagerung bei 40 °C. Also waren in der Lösung mehr intakte Ketten, was bedeutet, dass hier die Aggregate, die in der nicht-reduzierten SDS-PAGE detektiert wurden, durch DTT wieder zu intakten Ketten aufgebrochen werden konnten.

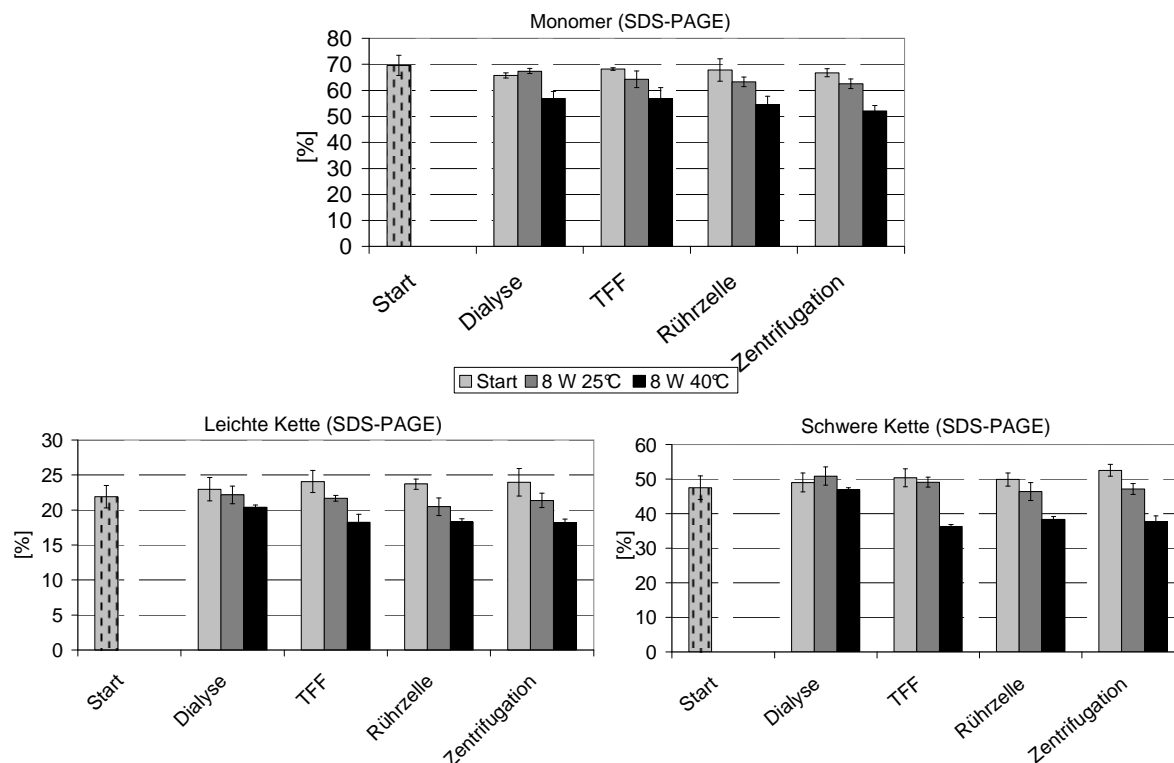


Abbildung 4.3.25: SDS-PAGE von Cetuximab-Proben mit einer Konzentration von 100 mg/ml vor (Start, hellgrau gestrichelt) und nach Aufkonzentrierung (hellgrau), nach Einlagerung bei 25°C (grau) und 40°C (schwarz), oben: Monomergehalt in nicht reduzierter SDS-PAGE; unten: Gehalte von links: leichter Kette, rechts: schwerer Kette in der reduzierten SDS-PAGE (fehlende Prozentanteile sind Aggregate oder Degradationsprodukte)

Dies war anscheinend in den Lösungen der anderen Techniken nicht möglich. Insgesamt wurden auch schon vor Einlagerung nur recht geringe Mengen Monomer (ca. 70%) detektiert. Dieses unerwartete Ergebnis deutete darauf hin, dass die Startlösung mit 10 mg/ml anscheinend auch schon Qualitätseinbußen im Vergleich zu den sonst in der Arbeit verwendeten 2 oder 5 mg/ml zeigte.

Auch mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) konnten chemische Veränderungen nach der Einlagerungszeit in den hochkonzentrierten Lösungen detektiert werden (Abb. 4.3.26). Die Werte vor und nach Aufkonzentrierung zeigten sehr ähnliche Kurvenverläufe. Daraus schlussfolgernd schien der Stress während der Aufkonzentrierung keine Veränderung am pI (isoelektrischen Punkt) hervorgerufen zu haben. Doch betrachtet man die Kurven nach 8 Wochen Einlagerung bei 25°C, ist eine Linksverschiebung, verglichen mit den Startwerten vor Einlagerung, erkennbar. Eine pI-Verschiebung zu geringeren Werten kann Deamidierungen anzeigen. Eine noch höhere Temperatur von 40°C ließ eine noch stärkere pI-Verschiebung zu kleineren Werten für die Proben aus den verschiedenen Aufkonzentrierungstechniken erkennen.

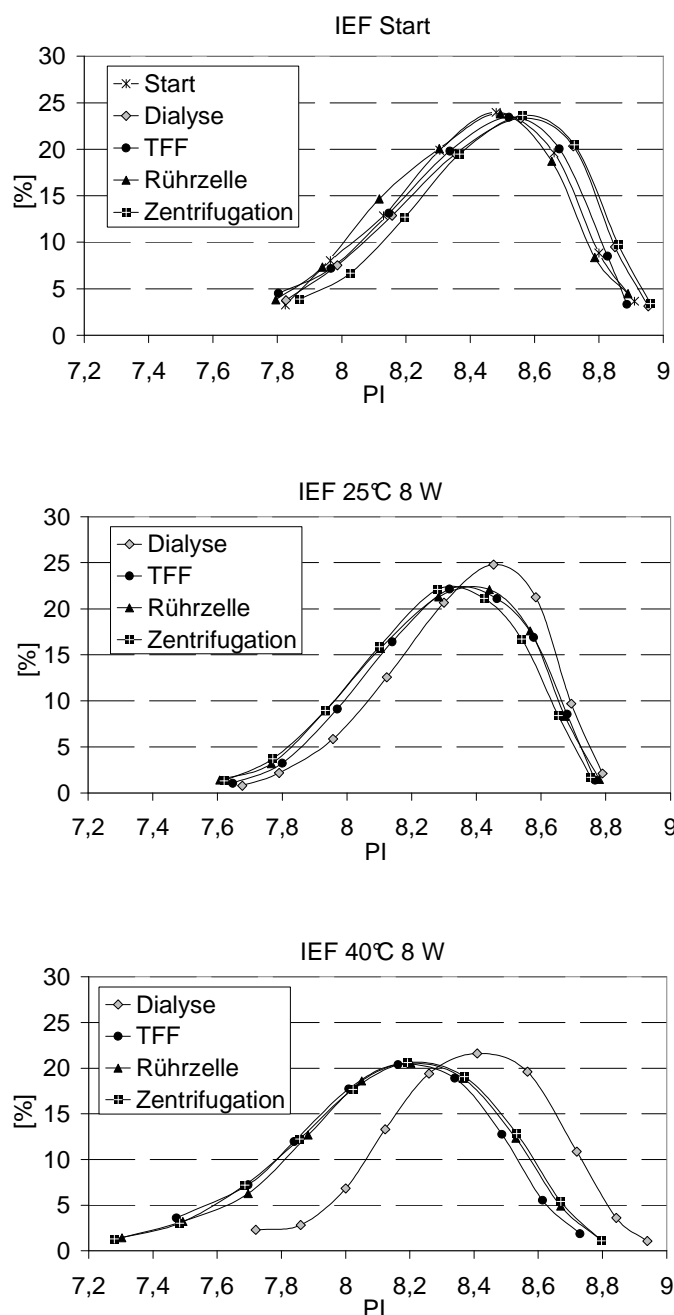


Abbildung 4.3.26: Cetuximab-Proben mit einer Konzentration von 100 mg/ml vor und nach Aufkonzentrierung (oben), nach Einlagerung bei 25°C (Mitte) und 40°C (unten). Es sind die IEF-Ergebnisse des prozentualen Anteils der Banden eines IEF-Laufes gegen die pI's aufgetragen.

Auffällig war allerdings, dass die Dialyse kaum eine Linksverschiebung aufwies, im Gegensatz zu allen anderen Techniken. Dies könnte folgendermaßen zu erklären sein: Die mildere, länger andauernde Aufkonzentrierung während der Dialyse stresste die Antikörper nicht so stark und es ergaben sich dadurch keine so starken Sekundär- und Tertiärstrukturveränderungen wie bei Verwendung der anderen Techniken. Diese Tertiärstrukturveränderungen waren aber direkt nach der Aufkonzentrierung noch so

schwach, dass keine Aggregate oder chemische Instabilitäten detektiert werden konnten. Nach 8 Wochen Einlagerung bei erhöhten Temperaturen äußerte sich die anfänglich leichte Veränderung dann dahingehend, dass bestimmte Aminosäuren, wie beispielsweise Asparagin durch eine andere Position in der Tertiärstruktur nun leichter deamidiert werden konnten. Wärme beschleunigt chemische Reaktionen und aus diesem Grund konnten die Instabilitäten so groß werden, dass sie als pI-Verschiebung ermittelt werden konnten. Hydrophobe Aminosäuren, die sich eventuell durch eine Sekundär-/ Tertiärstrukturänderung anfänglich anderweitig platzierten, traten in Wechselwirkung mit anderen hydrophoben Gruppen anderer Antikörper und trugen so zur Aggregatbildung bei, die aber auch erst nach 8 Wochen detektiert werden konnte. Interessant ist, dass diese Phänomene nicht direkt nach der Aufkonzentrierung beobachtet werden konnten, sondern erst nach gewisser Einlagerungszeit. Diesen Effekt könnte man auch mit „Memory effect“ beschreiben: Eine Instabilität, die durch Stress entstand (meist sehr leichte Strukturveränderungen im Protein), wird direkt nach diesem Stress noch nicht sichtbar, sondern erst nach gewisser Zeit und/oder nach einem weiteren Stress, wie in diesem Fall die Einlagerung bei Wärme. Dieser „Memory effect“ trat auch schon auf den pH-Wert bezogen auf [Vakos et al. 2000]. Diese Beobachtung zeigt, dass verschiedener physikalischer Stress (wahrscheinlich Scherung), produziert durch verschiedene Aufkonzentrierungstechniken, sich erst nach einiger Zeit äußert. Dies unterstreicht, dass es auch in Präformulierungsstudien wichtig ist, eine vergleichbare Technik zu der in der Produktion verwendeten Technik einzusetzen.

4.3.3.6 Zusammenfassende Diskussion

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass es mit den verwendeten Aufkonzentrierungstechniken Dialyse, Zentrifugalkonzentratoren, TFF und Rührzelle möglich ist, eine PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung mit einer Startkonzentration von 10 mg/ml auf 100 mg/ml aufzukonzentrieren und die erhaltenen hochkonzentrierten Lösungen miteinander zu vergleichen. Abschließend lässt sich sagen, dass die Filtration mittels Zentrifugalkonzentratoren eine geeignete „small scale“-Technik darstellt, die vergleichbare Ergebnisse mit der TFF hinsichtlich Qualität und Stabilität liefert. Auch in Bezug auf den Einsatz eines möglichst geringen Probenvolumens schnitten in den vorgelegten Versuchen die Zentrifugalkonzentratoren am besten ab. Bei den eingesetzten Prozessparametern war die Zentrifugation zudem die Methode mit der geringsten Aufkonzentrierungszeit. Die Ergebnisse der Zentrifugalkonzentratoren waren recht unabhängig von der Ausschlussgrenze,

gut reproduzierbar in der Machbarkeitsstudie und sehr ähnlich zur TFF in der Stabilitätsstudie.

Eine weitere Fragestellung war weiterhin, welcher Stress während der Aufkonzentrierung auf den Antikörper wirkt und wie er sich in der Qualität und Stabilität des hochkonzentrierten Produktes äußert. In der Literatur wird dieser Aufkonzentrierungs-Stress im Zusammenhang mit dem „Verblocken“ der Membran beschrieben [Bee et al. 2009b; Huisman et al. 2000; Maa und Hsu 1998; Maruyama et al. 2001b]. Auch in dem vorgelegten Fall konnte ein leichtes „Verblocken“ der Membranen (Rührzelle, Zentrifugalkonzentratoren) vermutet oder zumindest ein langsamerer Filtratfluss mit zunehmender Zeit visuell beobachtet werden. Der langsamere Filtratfluss war allerdings nicht aus den Konzentrations-Zeit-Profilen ersichtlich, da mit zunehmender Konzentration wesentlich geringere Filtratflüsse schon eine extreme Erhöhung der Konzentration bewirken. Leider konnten die Filtratflüsse nur während der Verwendung der TFF richtig gemessen werden. Die TFF startete die Aufkonzentrierung mit einem Filtratfluss von ca. 5 ml/min (bei 10 mg/ml) und endete mit einem Filtratfluss von ca. 0,56 ml/min bei einer Konzentration von 100 mg/ml. Huisman et al. beschreiben diesen Mechanismus so, dass zunächst Protein-Membran-Interaktionen auftreten, die im Laufe der Ultrafiltration in Protein-Protein-Interaktionen übergehen und Aggregate bilden können [Huisman et al. 2000]. Maruyama et al. detektierten während der Ultrafiltration von BSA sogar ein Verknüpfen von Cysteinresten innerhalb der BSA-Moleküle, was zu Aggregation führte. Auch Saluja et al. sahen einen Zusammenhang zwischen Aggregation [Saluja et al. 2007] ebenso wie dem pH Wert [Saluja et al. 2006] und der Rheologie (Viskosität) eines Antikörpers. Die Art von Stress, die diese Aggregate verursacht, wird als eine Interaktion zwischen hydrophoben Grenzflächen und der Lösung diskutiert [Bee et al. 2009b; Maa und Hsu 1998]. In den vorliegenden Versuchen war dieser Stress allerdings nicht in allen Aufkonzentrierungstechniken derselbe, denn TFF und Zentrifugalkonzentrator zeigten eine geringere Aggregatbildung als die andern Techniken. Erst nach Einlagerung mit vorhergehender Sterilfiltration konnten in allen Lösungen, abgesehen von der Dialyse ähnliche Aggregatgehalte detektiert werden.

Natürlich trägt zu einem geringeren Filtratfluss während der Aufkonzentrierung auch die hohe Viskosität der immer höher konzentrierten Proteinlösung einen wesentlichen Anteil bei. Bei 100 mg/ml beträgt diese z.B. 5 mPas*sec +/- 0,24 (Tab. 3.1.1). Kanai et al. beschreiben, dass sich diese Viskositätssteigerung bei erhöhten Konzentrationen auf Grund von einer reversiblen Selbst-Assoziation der Antikörper ergibt, die vorzugsweise am Fab-Fragment stattfindet [Kanai et al. 2008]. Diese Selbst-Assoziationen entstehen durch elektrostatische

Wechselwirkungen [Liu et al. 2005], die bei Erhöhung der Ionenstärke des Puffers teilweise verhindert werden können. Auch die hier beobachtete Viskosität ließe sich durch eine ausgereifte Formulierung sicherlich verringern.

In den vorliegenden Versuchen wurden keine Sekundär- oder Tertiärstruktur-Untersuchungen gemacht, da der Fokus hier auf einem schnellen Vergleich der Techniken lag. Derartige Untersuchungen wären rückblickend interessant gewesen und könnten Gegenstand weiterer Forschung sein. Wie in der Literatur beschrieben, ist es gerade bei hochkonzentrierten Lösungen wichtig, Methoden zu verwenden, die ein unverdünntes Messen zulassen (Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie, nano Differential Scanning Calorimetry, Fluoreszenz-Messungen) [Harn et al. 2007; Matheus et al. 2006a]. Damit können die oben beschriebenen Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden, die andernfalls durch Verdünnen zerstört werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden wie visuelle Kontrolle, Mikroskopie und Trübungsmessung ließen ein Messen der unverdünnten Proben zu, jedoch konnte die SEC nur mit verdünnten Proben durchgeführt werden. Bei Methoden wie IEF oder der SDS-PAGE hat das Verdünnen keine negative Auswirkung, da mit diesen Methoden sowieso keine nicht-kovalenten Proteinassoziate detektiert werden sollten.

Neben den hier dargestellten Konzentrierungsmethoden kann beispielsweise auch noch Präzipitation [Matheus et al. 2008] oder Sprühtrocknung [Dani et al. 2007] als Aufkonzentrierungstechnik angewendet werden. Diese Techniken können ebenfalls Konzentrationen weit über 100 mg/ml generieren. Da es sich aber bei der Präzipitation nicht um eine mechanische Aufkonzentrierungsart mit Filtereinfluss handelte und die Sprühtrocknung nicht in einem „small scale“ Format, welches hier untersucht wurde (1 ml Protein), durchgeführt werden kann, wurden diese Methoden nicht in den Vergleich mit einbezogen. Abhängig von der benötigten Proteinmenge hat jede Methode einen Volumenbereich, in dem sie einen Vorteil gegenüber anderen Methoden besitzt. Bei anderen Fragestellungen könnten sich also auch andere Methoden als besser bewähren, wie in der Literatur gezeigt wurde [Russell et al. 2007]. Auch Kombinationen der Methoden sind denkbar. So konnte für einen ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) beispielsweise die TFF mit anschließender Zentrifugation die gewünschten Ergebnisse liefern [Russell et al. 2007].

Interessant ist weiterhin, dass in diesem Versuch gesehen werden konnte, dass die hochkonzentrierten Lösungen instabiler gegen chemischen Stress (Temperatur) als gegen physikalischen Stress (Kapitel 4.3.1) sind [Daugherty und Mrsny 2006; Treuheit et al. 2002].

Die hier untersuchten Lösungen zeigten nach Aufkonzentrierung und anschließender Einlagerung einen erheblichen Qualitätsabfall. Allerdings wurde nur eine einfach gepufferte Antikörper-Lösung verwendet, um die Techniken besser unterscheiden zu können. Doch auch die Schüttelversuche wurden nur mit einfach gepufferter Antikörper-Lösung durchgeführt. Erhöhte Temperaturen, wie sie bei der Einlagerung auftraten, erhöhen die Protein-Protein-Interaktionen in der Lösung, mit der Folge, dass bei zusätzlicher Konzentrationszunahme verstärkt Protein-Protein-Interaktionen auftreten, die dann zur Aggregatbildung in der Lösung führen können [Treuheit et al. 2002]. Im Gegensatz dazu sind, wie aus Kap 4.3.1 und 4.3.2 hervorgeht, hochkonzentrierte Lösungen in Schüttelstress-Versuchen stabiler als gering konzentrierte. Grund dafür ist der prozentual geringere Kontakt der Antikörper mit der Luft-Wasser-Grenzfläche in hochkonzentrierten Lösungen [Treuheit et al. 2002]. Die Ergebnisse nach Einlagerung allerdings zeigen, dass anscheinend ein mechanischer Stress, der zu Beginn noch keine detektierbaren Instabilität verursachte, doch einen Einfluss auf die Stabilität bei späterer Einlagerung haben kann. Die Dialyse, die die mildeste Aufkonzentrierungstechnik war, zeigte nach Einlagerung wesentlich weniger Instabilitäten als die anderen Techniken. Dies kann, wie bereits angesprochen, auf die lange Aufkonzentrierungszeit und das geringe Scheren der Lösung zurückgeführt werden.

5. Abschlussdiskussion

Bevor ein Proteinarzneimittel die Marktreife erlangt, wird die Stabilität gegen physikalischen Stress und gegen chemischen Stress untersucht. Für den chemischen Stress gibt es Richtlinien, die z.B. den Wärmestress beschreiben [ICH Guideline Q1A (R2) 2003]. Hier kommt es u.a. auf die Temperatur und die Dauer der Einlagerung an. Diese zwei Größen können eindeutig in einem Stressmodell eingestellt werden. Im Gegensatz dazu sind die Ursachen der physikalischen Instabilitäten nicht so einfach festzumachen und einzustellen. Bisher gibt es keine Richtlinien für physikalischen Stress. Deshalb war es Ziel der Arbeit, physikalische Stressmodelle zu entwickeln, die eine Unterscheidung zwischen einer gut formulierten Marktformulierung und einer noch unformulierten oder nicht ausreichend stabilisierten Antikörper-Lösung in Präformulierungsstudien sichtbar machen.

Außerdem sollte der physikalische Stress, der auf die Antikörper während dieses Stresses wirkt und für die Instabilitäten verantwortlich ist, identifiziert und analysiert werden. Physikalischer Stress entsteht während der Herstellung, des Transportes und der Verabreichung von Antikörpermedikamenten [Wang et al. 2007]. Antikörper sind sehr empfindlich gegenüber Stress. Es besteht die Gefahr der Aggregatbildung in den gestressten Lösungen [Carpenter et al. 1999; Liu et al. 2008a]. Um Voraussagen machen zu können, welche Formulierung den Antikörper am besten gegen physikalischen Stress schützt, werden Stresstests wie Rühren oder Schütteln durchgeführt [Mahler et al. 2005a]. Da es aber bisher keine Richtlinien für Rühr- oder Schüttelstress gibt, werden sehr unterschiedliche Schüttelstressdesigns verwendet. Allerdings können unterschiedliche Schüttelparameterkombinationen unterschiedliche Instabilitäten in derselben Antikörperlösung verursachen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Die Stabilität einer entwickelten Antikörperformulierung kann nur bei Einhaltung desselben Schüttelprotokolls mit Stabilitäten anderer Formulierungen verglichen werden.

Doch welche Faktoren sind überhaupt verantwortlich für den physikalischen Stress, der auf Proteine wirkt? Nur wenn man diesen kennt, können entsprechende Stressprotokolle überhaupt entwickelt werden. Es werden in der Literatur mehrere Hypothesen diskutiert. Z.B. können sich Proteine durch die Anlagerung an hydrophobe Oberflächen oder Grenzflächen wie die zur Luft partial entfalten und schließlich aggregieren [Bee et al. 2009b]. Eine andere Hypothese besagt, dass Scherstress für die Aggregation von Proteinen eine wichtige Rolle spielt [Oliva et al. 2003]. Dies wird kontrovers diskutiert. Die meisten Autoren vermuten, dass ein Zusammenspiel von Scherung und Kontakt zur hydrophoben Oberfläche (Luft-

Wasser-Grenzfläche) die Ursache für physikalische Instabilitäten darstellt [Maa und Hsu 1997; Mahler et al. 2005a]. Allerdings sind diese beiden „Stressgrößen“ schwer in Stressmodellen einzustellen. Beim Schütteln z.B., wie in den Hochgeschwindigkeitsaufnahmen in der vorliegenden Arbeit gesehen werden konnte, ergaben sich abhängig von Schüttelgeschwindigkeit, Füllmenge der Vials und Vialgröße unterschiedliche Luft-Wasser-Grenzflächen. Auch Oberflächenspannung und Viskosität der Lösung wie auch der Hub des Schüttlers sind wichtige Parameter, die die Luft-Wasser-Grenzfläche oder Scherung verändern können. Somit ist es nahe liegend, dass eine allgemeingültige Richtlinie für Schüttelstress nur schwer zu entwickeln ist. In der vorliegenden Arbeit ist es aber dennoch gelungen, jeweils eine Schüttel- und Rührbedingung im Rahmen der Präformulierung zu entwickeln, die in einem Konzentrationsbereich von 2-5 mg/ml unter Verwendung des Beispielantikörpers Cetuximab zwischen der aktuellen Marktformulierung und einer nur PBS-gepufferten Lösung unterscheiden konnte.

Es war überraschend festzustellen, dass sich vor allem beim Rühren die beiden Lösungen in ihrer Stabilität zunächst kaum unterschieden. Erst durch Füllmengenreduzierung und damit einer relativen Vergrößerung der Luft-Wasser-Grenzflächen konnte beim Rühren eine Diskriminierung zwischen den zwei Lösungen erreicht werden. Diese Beobachtung ist sehr interessant, denn sie spricht dafür, dass die Luft-Wasser-Grenzfläche anscheinend einen erheblichen Teil zur Destabilisierung der Lösung beiträgt. Eine ausgereifte Formulierung kann vor dieser Destabilisierung schützen. Hier stellt sich nun die Frage, welche Hilfsstoffe in der Formulierung diesen stabilisierenden Effekt bedingen. Wahrscheinlich ist der Schutz auf das oberflächenaktive Tween innerhalb dieser Lösung zurückzuführen, welches sich an Luft-Wasser-Grenzflächen setzt und somit die Proteine davor bewahrt, sich dort zu entfalten [Kerwin 2007]. Tween wie auch andere Tenside werden, wie in der Literatur beschrieben, sehr häufig als stabilisierende Hilfsstoffe gegen physikalischen Stress in Proteinlösungen eingesetzt [Kiese et al. 2008; Parkins und Lashmar 2000].

Es konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass Tween die Lösung besser gegen Schüttelstress als gegen reinen Scherstress (Rührstress ohne Luft) oder Luft-Wasser-Grenzflächenstress (Begasen) stabilisiert [Kiese et al. 2008; Mahler et al. 2005a]. Es stellt sich die Frage, warum dies so beobachtet wurde. Wahrscheinlich liegt es beim Rühren (ohne Luft) an der fehlenden Luft-Wasser-Grenzfläche und beim Begasen an der doch prozentual kleineren Luft-Wasser-Grenzfläche im Vergleich zum Schütteln. Tween stabilisiert aufgrund seiner Oberflächenaktivität wahrscheinlich besser gegen Luft-Wasser-Grenzflächenstress als gegen Scherung. Deshalb konnte in den Rührversuchen auch erst eine Diskriminierung bei

Erniedrigung der Füllmengen, also relativen Erhöhung der Luft-Wasser-Grenzfläche, zwischen Marktformulierung (enthält Tween) und PBS-gepufferter Lösung erreicht werden. Dieses Ergebnis deutet wiederum auf die Luft-Wasser-Grenzfläche als Hauptursache für physikalischen Stress.

Das bedeutet für die Entwicklung einer Stressmethode in Präformulierungsstudien, dass ein Stressdesign gewählt werden sollte, das auf der einen Seite genügend Luft-Wasser-Grenzflächen hervorbringt. Auf der anderen Seite sollte aber in kurzer Zeit kein zu starker Stress ausgeübt werden. Der Stress sollte so gewählt sein, dass die Schwelle zu einer Aggregatbildung in einer angemessenen Zeit (48 - 120 h) überschritten wird. Die Versuchparameter, mit welchen eine Diskriminierung zwischen den beiden Lösungen geschaffen werden konnte, waren letztendlich für das Rühren: 500 µl Füllmenge in einem 2 ml-Vial, Rühren mit 120 U/min für 48 h mit Magnetrührstäbchen der Größe 3 x 8 mm bei Raumtemperatur. Für das Schütteln resultieren die Parameter 1 ml Füllmenge in einem 2 ml-Vial geschüttelt bei 200 U/min mit einem Hub von 3 cm für 48 h oder 120 h, ebenfalls bei Raumtemperatur. Das Rühren zeigte allerdings eine schlechtere Reproduzierbarkeit als das Schütteln.

Wenn nun davon ausgegangen wird, dass hauptsächlich die Luft-Wasser-Grenzfläche, eventuell auch die Scherung, den Stress auf die Proteine verursacht, dann müssten diese Faktoren für eine Entwicklung von Stressmodellen zuvor quantifiziert und voneinander abgegrenzt werden. Dieser Fragestellung nachzugehen, gestaltet sich schwierig. In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch experimentelle Versuche, die auf der einen Seite nur das Scheren (Rühren ohne Luft) und auf der anderen Seite nur den Kontakt zur Luft-Wasser-Grenzfläche (Begasen der Lösung mit Luft) darstellen sollten, versucht. Mit diesen Versuchen war eine Differenzierung der beiden „Stressgrößen“ allerdings nur bedingt möglich. Z.B. kann ein Scheren der Lösung entlang der Glaswand beim Begasen nicht ausgeschlossen werden, da auch Strömungen innerhalb der Lösung auftreten. Beim Rühren ohne Luft war zwar keine Luft-Wasser-Grenzfläche vorhanden, aber eine Grenzfläche zum Stopfen oder Magnetrührstäbchen gegeben.

Eine andere Idee, mit welcher versucht wurde, die Fragestellung zu beantworten, war das Durchführen einer CFD-Simulation (Computational Fluid Dynamics). Eine CFD-Simulation kann die Scherung (Schubspannung), die innerhalb der Lösung während des Schüttelvorgangs auftritt, gesondert von Luft-Wasser-Grenzfläche strömungsdynamisch berechnen. Die CFD-Simulation wäre somit eine sehr gute, bisher nicht publizierte Alternative, diese „Stressgrößen“ zu berechnen und mit Laborergebnissen (Instabilitäten des Antikörpers) zu

vergleichen. So könnte herausgefunden werden, welche „Stressgröße“ für welche Instabilität verantwortlich ist. Da der Schüttelvorgang allerdings die Bewegung eines Zwei-Phasen-Gemisches darstellt, sind die Berechnungen der Simulation sehr komplex und konnten in der vorgegebenen Zeit mit den hier verwendeten Rechnungen nicht fehlerfrei entwickelt werden. Die Beseitigung von Fehlern wie z.B. die Berechnung einer falschen Benetzung der Glaswand, laminares Strömungsverhalten anstelle von turbulenter Strömung oder eine ungünstig gewählte Gitterstruktur, könnte in weiterführenden Studien zu realistischeren Simulationen führen.

Der Informationsgehalt einer korrekten Simulation wäre sicherlich sehr aufschlussreich, denn schon in den hier vorgelegten Berechnungen wurde deutlich, dass z.B. neben den in dieser Arbeit in experimentellen Versuchen variierten Parametern, wie Füllmenge, Vialgröße und Schüttelgeschwindigkeit auch die Form des Vials und die Stoffgrößen wie Oberflächenspannung und Viskosität einen großen Einfluss auf die Strömungen der Lösungen haben. Infolgedessen können unterschiedliche Scherungen bzw. Luft-Wasser-Grenzflächen entstehen, die wiederum unterschiedliche Instabilitäten bedingen. Wieder wird sichtbar, dass die Einhaltung gleicher „Stressgrößen“ (= Scherung, Luft-Wasser-Grenzflächenstress) in allgemeingültigen physikalischen Stressmodellen schwer zu realisieren ist.

Die Parameter Viskosität und Oberflächenspannung sind abhängig von der zu untersuchenden Lösung. Eine Konzentrationserhöhung beispielsweise trägt auch zu einer Viskositätserhöhung bei [Kanai et al. 2008; Salinas et al. 2010]. Da die Strömungen während des Schüttelns dadurch verändert werden, können andere Luft-Wasser-Grenzflächen oder Scherungen entstehen. Hochkonzentrierte Antikörperlösungen (100 mg/ml) verhalten sich in Schüttelstresstests stabiler als geringer konzentrierte Lösungen [Daugherty und Mrsny 2006; Treuheit et al. 2002]. Dies konnte auch für den Monomergehalt in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Der Zusatz von Tween kann zu veränderten Oberflächenspannungen führen, welche ebenfalls letztendlich andere Luft-Wasser-Grenzflächen oder Scherungen bedingen können. Das stabilere Abschneiden von tweenhaltigen und hochkonzentrierten Lösungen im Vergleich zu gering konzentrierten nicht-tweenhaltigen Lösungen könnte folglich auch auf veränderte Strömungseigenschaften während des Schüttelns zurückzuführen sein.

Um all diese Effekte auf das Analysenergebnis sinnvoll zu detektieren und zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein statistisches Versuchsdesign (DOE) durchgeführt [Fisher 1936]. In den Rühr- und Schüttelversuchen zu Beginn der Arbeit wurde jeweils immer nur ein Parameter geändert und dessen Auswirkung auf das Analysenergebnis betrachtet. Mit Hilfe eines statistischen Versuchsdesigns ist es möglich, mehrere Parameter zu ändern und die

Wechselwirkungen untereinander ebenso wie die Auswirkungen auf das Endergebnis zu detektieren. Allerdings sollten hierfür die zu beobachtenden Effekte, wie z.B. Monomergehaltsabfall oder Anstieg von Aggregaten eindeutig zu beobachten sein und nicht in Standardabweichungen, die z.B. durch die Analysenmethode bedingt sind, untergehen. Dies war in der vorliegenden Arbeit der Fall, weswegen die Aussagekraft der hier durchgeführten DOE-Versuche recht gering ist.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Experimente im statistischen Versuchsdesign konnte festgestellt werden, dass vor allem die Detektion des absoluten Monomergehaltes für hochkonzentrierte Lösungen nicht sehr aussagekräftig ist. Zum einen können so hochkonzentrierte Lösungen nicht ohne Verdünnung gemessen werden, zum anderen ist, prozentual betrachtet, bei einer hochkonzentrierten Lösung der Monomergehaltsabfall immer sehr gering. Durch das Verdünnen können darüber hinaus auch lockere Aggregatzusammenschlüsse wieder zerstört werden [Matheus et al. 2006b]. Analysenmethoden, in welchen die native Probe gemessen werden kann, bieten in diesem Zusammenhang einen klaren Vorteil, wie z.B. die Analyse mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie [Matheus et al. 2006b]. Dies wäre vielleicht ein Erfolg versprechender Ansatz für die Zukunft.

Ein weiteres allgemeines Problem der Analysenmethoden in der Proteinanalytik besteht darin, dass sich meist unterschiedliche Größen von Aggregaten bilden, die nicht alle mit derselben Analysenmethode erfasst werden können [Philo 2006]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auch der absolute Monomergehalt detektiert, um alle Instabilitäten zusammen über den Monomergehaltsabfall erfassen zu können. Ein weiteres Hindernis in der Präformulierung sind die kleinen Probenmengen, aufgrund derer viele Analysenmethoden wie z.B. Nephelometrie, Lichtblockade und nanoDSC (Dynamische Differenzkalorimetrie) nicht durchgeführt werden können.

In weiterführenden Studien könnten in „large scale“-Versuchen größere Mengen Antikörper gestresst werden. Im Anschluss daran könnten dann die genannten Analysenmethoden wie Nephelometrie, Lichtblockade und nanoDSC verwendet und dadurch der Schüttelstress vielleicht besser verstanden werden. Auch Analysenmethoden, die die Änderungen in Sekundär- und Tertiärstruktur detektieren können, wären interessant durchzuführen. So könnte schon frühzeitig eine Veränderung des Antikörpers durch physikalischen Stress bemerkt werden. In den Aufkonzentrierungsstudien in dieser Arbeit konnte schließlich gezeigt werden, dass ein physikalischer Stress sich nicht zwangsläufig direkt nach Stressung zeigen muss, sondern auch erst nach Einlagerung bei erhöhten Temperaturen sichtbar werden

kann. Dies hätte mit entsprechenden analytischen Methoden (FTIR, Circular dichroismus, Fluoreszenzmessungen) möglicherweise direkt nach Aufkonzentrierung schon erkannt werden können, so dass eventuell sogar keine Einlagerungszeit mehr abgewartet hätte werden müssen, oder das Ergebnis nach der Lagerzeit schon abschätzbar gewesen wäre. Auch der Zusammenhang zwischen anfänglicher partieller Entfaltung eines Antikörpers (detektierbar über FTIR, Circular dichroismus, Fluoreszenzmessungen) und nach Lagerzeit entstandenen Aggregaten könnte damit aufgeklärt werden.

6. Zusammenfassung

Physikalischer Stress auf Antikörperlösungen äußert sich vorrangig durch Aggregation, meist durch Bildung unlöslicher Aggregate. Es werden verschiedene analytische Methoden benötigt, um die Aggregate in den unterschiedlichen Größenbereichen zuverlässig zu detektieren. Richtlinien für die Durchführung von Untersuchungen mittels physikalischen Stresses wie Schütteln oder Rühren zur Ermittlung der stabilsten Formulierung in der Formulierungsentwicklung gibt es bisher nicht. Das führt dazu, dass in der Praxis verschiedene Schüttel- und Rührdesigns verwendet werden. Allerdings haben Variationen der Stressparameter erhebliche Auswirkungen auf die Ergebnisse. Deshalb wurden in dieser Arbeit „small scale“-Methoden für das Schütteln und Rühren entwickelt, die es in einem Konzentrationsbereich von 2-5 mg/ml möglich machen, eine noch nicht ausreichend formulierte Antikörperlösung mit einer Marktformulierung hinsichtlich ihrer Stabilität gegen physikalischen Stress zu vergleichen und zu beurteilen. Die diskriminierenden Versuchsparameter sind für das Rühren 500 µl Füllmenge in einem 2 ml-Vial, gerührt mit 120 U/min mit einem Magnetrührstäbchen der Größe 8 x 3 mm für 48 h bei Raumtemperatur. Für das Schütteln ergeben sich die Parameter 1 ml Füllmenge in einem 2 ml-Vial horizontal geschüttelt bei 200 U/min (Hub 3 cm) für 48 h oder 120 h bei Raumtemperatur.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Ursachen für die nachgewiesenen Instabilitäten während des Schüttelns zu identifizieren. Hier wurden die in der Literatur diskutierten Parameter wie Anwesenheit von Luft-Wasser-Grenzfläche und Bildung von Scherstress untersucht. Diese beiden Stressgrößen wurden mittels einer Computational-Fluid-Dynamics-Simulation berechnet. Die Simulation war sehr kompliziert, da es sich um eine bewegte Zwei-Phasen-Strömung handelte und konnte nicht fehlerfrei berechnet werden. Es konnte jedoch daraus abgeleitet werden, dass die Form des Vials und Stoffgrößen wie Oberflächenspannung und Viskosität auch das Endergebnis beeinflussen können. Ein weiterer Versuchansatz imitierte den Scherstress durch Rühren ohne die Anwesenheit von Luft und verglich diesen mit einem möglichst reinen Luft-Wasser-Grenzflächenstress mittels Begasen. Hierbei wurden sehr unterschiedliche Instabilitäten/ Aggregate detektiert, die nicht mit denen des Schüttelstresses vergleichbar waren. Das Scheren erzeugte eher kleine Aggregate, während der Luft-Wasser-Grenzflächen-Stress recht große Aggregate hervorbrachte, die die Lösung nicht so stark trübten. Die Aggregate des Schüttelstresses hingegen befanden sich in Größe und auch Größenverteilung zwischen denen des „reinen“ Rühr- und Luft-Wasser-

Grenzflächenstress. Unterschiedliche Arten von physikalischem Stress können also unterschiedliche Instabilitäten verursachen.

Auch der Effekt von Tween 80 wurde in dieser Arbeit untersucht. Es stellt, wie auch andere Tenside, einen wichtigen Hilfsstoff zur Stabilisierung von Proteinarzneimitteln gegen physikalischen Stress dar. Es wird vermutet, dass sich Tween 80 aufgrund seiner Oberflächenaktivität an Luft-Wasser-Grenzflächen anlagert und so die Proteine davor bewahrt, sich dort anzusammeln, zu entfalten und letztendlich zu aggregieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tween 80 den Antikörper sehr gut vor Schüttelstress schützte, weniger aber vor Scherstress (Rührstress ohne Luft) oder Luft-Wasser-Grenzflächenstress alleine. Auch hochkonzentrierte Lösungen wurden durch Tween 80 während des Schüttelns stabilisiert.

Hochkonzentrierte Lösungen (100 mg/ml) zeigten insgesamt eine wesentlich bessere Schüttel-Stabilität als gering konzentrierte Lösungen (5 mg/ml), jedenfalls in Bezug auf den Monomergehalt. Das kann daran liegen, dass hochkonzentrierte Lösungen prozentual weniger Proteine an der Luft-Wasser-Grenzfläche exponieren und deshalb prozentual weniger Proteine dort aggregieren. Auf die Trübung bezogen, konnten allerdings ähnliche Ergebnisse wie in den gering konzentrierten Lösungen beobachtet werden, weil, absolut betrachtet, eine ähnliche Menge an Aggregaten entstand. Diese Aggregate erschienen unter dem Mikroskop allerdings kugelförmig im Gegensatz zu den faserigen Aggregaten in den gering konzentrierten Lösungen.

Bei der Durchführung eines statistischen Versuchsdesigns (DOE) waren die zu detektierenden Effekte bei Verwendung von hochkonzentrierten Antikörperlösungen geringer als die durch die Analysenmethode bedingten Abweichungen. Nur eine Stabilisierung (bezogen auf den Monomergehalt) gegen physikalischen Stress durch Konzentrationserhöhung konnte herausgelesen werden.

Während einer Aufkonzentrierung (hier auf 100 mg/ml als Zielgröße) wird ebenfalls physikalischer Stress auf das Protein ausgeübt. In dieser Arbeit wurde eine „small scale“-Technik gesucht, die vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Stabilität des aufkonzentrierten Antikörpers liefert wie die später in der Produktion verwendete Tangentialstromfiltration (TFF). Als besonders geeignet in dieser Hinsicht erwiesen sich Zentrifugalkonzentratoren, die neben Dialyse und Rührzellfiltration im Vergleich zur TFF untersucht wurden. Die Dialyse war die schonendste Technik, was aber erst nach Einlagerung der Proben bei unterschiedlichen Temperaturen durch weniger Instabilitäten nachweisbar wurde. Aufbauend auf den hier erhaltenen Ergebnissen könnten in weiterführenden Studien

andere analytische Methoden wie Fluoreszenz- oder FTIR-Messungen herangezogen werden, um eventuelle Tertiär- bzw. Sekundärstrukturveränderungen frühzeitig nach Stressung/Aufkonzentrierung zu erkennen.

Literaturverzeichnis

Aliabadi S., Johnson A. und Abedi J., Comparison of finite element and pendulum models for simulation of sloshing, *Comput. Fluids* **32**:535-545 (2003)

Arakawa T. und Kita Y., Protection of bovine serum albumin from aggregation by Tween 80, *J. Pharm. Sci.* **89**:646-651 (1999)

Bam N.B., Cleland J.L., Yang J., Manning M.C., Carpenter J.F., Kelley R.F. und Randolph T.W., Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions, *J. Pharm. Sci.* **87**:1554-1559 (1998)

Bam N.B., Randolph T.W. und Cleland J.L., Stability of protein formulations: Investigation of surfactant effects by novel EPR spectroscopic technique, *Pharm. Res.* **12**:2-11 (1995)

Baselga J., The EGFR as a target for anticancer therapy - focus on cetuximab, *Eur. J. Cancer* **37**:16-22 (2001)

Bauer K.H., Frömming K.H., and Führer C., Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, 7.Auflage, Stuttgart, 2002, S.70

Bauer R., Müller A., Richter M., Schneider K., Frey J. und Engelhardt W., Influence of heavy metal ions on antibodies and immune complexes investigated by dynamic light scattering and enzyme-linked immunosorbent assay, *Biochim. Biophys. Acta* **1334**:98-108 (1997)

Bee J.S., Chiu D., Sawicki S., Stevenson J.L., Chatterjee K., Freund E., Carpenter J.F. und Randolph T.W., Monoclonal antibody interactions with micro- and nanoparticles: Adsorption, aggregation, and accelerated stress studies, *J. Pharm. Sci.* **98**:3218-3238 (2009a)

Bee J.S., Stevenson J.L., Mehta B., Svitel J., Pollastrini J., Platz R., Freund E., Carpenter J.F. und Randolph T.W., Response of a concentrated monoclonal antibody formulation to high shear, *Biotechnol. Bioeng.* **103**:936-943 (2009b)

Bischoff R. und Kolbe H.V., Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides: structural determinants and analytical methodology, *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **662**:261-278 (1994)

Bock P.E. und Frieden C., Another look at the cold lability of enzymes, *Trends Biochem. Sci.* **3**:100-103 (1978)

Bogard W.C., Jr., Dean R.T., Deo Y., Fuchs R., Mattis J.A., McLean A.A. und Berger H.J., Practical considerations in the production, purification, and formulation of monoclonal antibodies for immunoscintigraphy and immunotherapy, *Semin. Nucl. Med.* **19**:202-220 (1989)

- Brange J., Andersen L., Laursen E.D., Meyn G. und Rasmussen E., Toward understanding insulin fibrillation., *J Pharm Sci* **86**:517-525 (1997)
- Brekke O.H. und Loset G.A., New technologies in therapeutic antibody development, *Current Opinion in Pharmacology* **3**:544-550 (2003)
- Brose D.J., Dosmar M., and Jornitz M.W., Membrane filtration, in: Nail S.L., Akers M.J., Development and manufacture of protein pharmaceuticals, *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, 2002, 213-279
- Burke C.J., Steadman B.L., Volkin D.B., Tsai P.-K., Bruner M.W. und Middaugh C.R., The adsorption of proteins to pharmaceutical container surfaces, *Int. J. Pharm.* **86**:89-93 (1992)
- Carpenter G., Receptors for Epidermal Growth Factor and Other Polypeptide Mitogens, *Annual Review of Biochemistry* **56**:881-914 (1987)
- Carpenter J.F., Kendrick B.S., Chang B.S., Manning M.C. und Randolph T.W., Inhibition of stress-induced aggregation of protein therapeutics, *Methods Enzymol.* **309**:236-255 (1999)
- Chan H.K., Au-Yeung K.L. und Gonda I., Effects of additives on heat denaturation of rhDNase in solutions, *Pharm. Res.* **13**:756-761 (1996)
- Chang B.S. and Hershenson S., Practical approaches to protein formulation development, in: Carpenter J.F., Manning M.C., Rational design of stable protein formulations, *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, 2002, 1-25
- Charman S.A., Mason K.L. und Charman W.N., Techniques for assessing the effects of pharmaceutical excipients on the aggregation of porcine growth hormone, *Pharm. Res.* **10**:954-962 (1993)
- Chou D.K., Krishnamurthy R., Randolph T.W., Carpenter J.F. und Manning M.C., Effects of Tween 20 and Tween 80 on the stability of Albutropin during agitation, *J. Pharm. Sci.* **94**:1368-1381 (2005)
- Chumsae C., Gaza-Bulsecu G., Sun J. und Liu H., Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **850**:285-294 (2007)
- Cleland J.L., Powell M.F. und Shire S.J., The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* **10**:307-377 (1993)
- Clery C., Renault F. und Masson P., Pressure-induced molten globule state of cholinesterase, *FEBS Lett.* **370**:212-214 (1995)
- Cornerstone® Handbücher, experimental design 1.1, *Brooks Automation, Inc.*, Chelmsford, 2003

- Dani B., Platz R. und Tzannis S.T., High concentration formulation feasibility of human immunoglobulin G for subcutaneous administration, *J. Pharm. Sci.* **96**:1504-1517 (2007)
- Daugherty A.L. und Mrsny R.J., Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**:686-706 (2006)
- Dehart M.P. und Anderson B.D., The role of the cyclic imide in alternate degradation pathways for asparagine-containing peptides and proteins, *J. Pharm. Sci.* **96**:2667-2685 (2007)
- Demeule B., Gurny R. und Arvinte T., Where disease pathogenesis meets protein formulation: renal deposition of immunoglobulin aggregates, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **62**:121-130 (2006)
- Demeule B., Gurny R. und Arvinte T., Detection and characterization of protein aggregates by fluorescence microscopy, *Int. J. Pharm.* **329**:37-45 (2007a)
- Demeule B., Lawrence M.J., Drake A.F., Gurny R. und Arvinte T., Characterization of protein aggregation: the case of a therapeutic immunoglobulin, *Biochim. Biophys. Acta* **1774**:146-153 (2007b)
- Eckhardt B.M., Oeswein J.Q., Yeung D.A., Milby T.D. und Bewley T.A., A turbidimetric method to determine visual appearance of protein solutions, *J. Pharm. Sci. Technol.* **48**:64-70 (1994)
- Eisenberg H., Josephs R. und Reisler E., Scattering correction to the absorbance, wavelength dependence of the refractive index increment, and molecular weight of the bovine liver glutamate dehydrogenase oligomer and subunits, *Biopolymers* **16**:2773-2783 (1977)
- Ennis B.W., Lippman M.E. und Dickson R.B., The EGF receptor system as a target for antitumor therapy, *Cancer Invest* **9**:553-562 (1991)
- Eswaran M., Saha UK. und Maity D., Effect of baffles on a partially filled cubic tank: numerical simulation and experimental validation, *Comput. Struct.* **87**:198-205 (2009)
- Europäisches Arzneibuch 6.0, Kapitel 2.2.1, Klarheit und Opaleszenz von Lösungen (2008a)
- Europäisches Arzneibuch 6.0, Kapitel 2.9.19, Nichtsichtbare Partikel (2008b)
- Europäisches Arzneibuch 6.0, Kapitel 2.9.20, Sichtbare Partikel (2008c)
- Fachinformation Erbitux[®], 5 mg/ml Infusionslösung (2009)
- Fields G.B., Darwin O.V., Alonso D.S., Stigter D. und Dill K.A., Theory for the aggregation of proteins and copolymers, *J. Phys. Chem.* **96**:3974-3981 (1992)

- Fisher R.A., The design of experiments, *Br.Med.J.*, Edinburgh, 1936, 554
- Fradkin A.H., Carpenter J.F. und Randolph T.W., Immunogenicity of aggregates of recombinant human growth hormone in mouse models, *J. Pharm. Sci.* **98**:3247-3264 (2009)
- Gabrielson J.P., Brader M.L., Pekar A.H., Mathis K.B., Winter G., Carpenter J.F. und Randolph T.W., Quantitation of aggregate levels in a recombinant humanized monoclonal antibody formulation by size-exclusion chromatography, asymmetrical flow field flow fractionation, and sedimentation velocity, *J. Pharm. Sci.* **96**:268-279 (2007)
- Garidel P., Hoffmann C. und Blume A., A thermodynamic analysis of the binding interaction between polysorbate 20 and 80 with human serum albumins and immunoglobulins: a contribution to understand colloidal protein stabilisation, *Biophys. Chem.* **143**:70-78 (2009)
- Giancola C., De Sena C., Fessas D., Graziano G. und Barone G., DSC studies on bovine serum albumin denaturation: Effects of ionic strength and SDS concentration, *Int. J. Biol. Macromol.* **20**:193-204 (1997)
- Goldstein N.I., Giorgio N.A., Jones S.T. und Saldanha J.W., Antibody and antibody fragments for inhibiting the growth of tumors WO1996US09847 19960607, 1-121 (1996)
- Golovanov A.P., Hautbergue G.M., Wilson S.A. und Lian L.Y., A simple method for improving protein solubility and long-term stability, *J. Am. Chem. Soc.* **126**:8933-8939 (2004)
- Gombotz W.R., Pankey S.C., Bouchard L.S., Phan D.H. und MacKenzie A.P., Stability, characterization, formulation, and delivery system development for transforming growth factor-beta 1, *Pharm. Biotechnol.* **9**:219-245 (1996)
- Goto Y. und Fink A.L., Acid-induced folding of heme proteins, *Methods Enzymol.* **232**:3-15 (1994)
- Gun'ko V.M., Klyuevba A.V., Levchuk Y.N. und Leboda R., Photon correlation spectroscopy investigations of proteins, *Advances in Colloid and Interface Science* **105**:201-328 (2003)
- Harn N., Allan C., Oliver C. und Middaugh C.R., Highly concentrated monoclonal antibody solutions: direct analysis of physical structure and thermal stability, *J. Pharm. Sci.* **96**:532-546 (2007)
- Harrison J.S., Gill A. und Hoare M., Stability of a single-chain Fv antibody fragment when exposed to a high shear environment combined with air-liquid interfaces, *Biotechnol. Bioeng.* **59**:517-519 (1998)
- Hartmann W.K., Saptharishi N., Yang X.Y., Mitra G. und Soman G., Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid chromatography with quadruple detection, *Anal. Biochem.* **325**:227-239 (2004)

- Hawe A., Kasper J.C., Friess W. und Jiskoot W., Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress, *Eur. J. Pharm. Sci.* **38**:79-87 (2009)
- Hazen K.C., Bourgeois L.D. und Carpenter J.F., Cryoprotection of antibody by organic solutes and organic solute/divalent cation mixtures, *Arch. Biochem. Biophys.* **267**:363-371 (1988)
- Huisman I.H., Prádanos P. und Hernández A., The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration, *J. Membr. Sci.* **179**:79-90 (2000)
- ICH Guideline Q1A (R2), Stability testing of new drug substances and products, *International Conference on Harmonisation* 1-15 (2003)
- ICH Guideline Q1B, Photostability testing of new drug substances and products, *International conference on harmonisation* 1-8 (1996)
- Jaenicke R., Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions, *Eur. J. Biochem.* **202**:715-728 (1991)
- Jensen W.A., Armstrong J.M., De Giorgio J. und Hearn M.T., Stability studies on pig heart mitochondrial malate dehydrogenase: the effect of salts and amino acids, *Biochim. Biophys. Acta* **1296**:23-34 (1996)
- Jones L.S., Bam N.B. und Randolph T.W., Surfactant-stabilized protein formulations: a review of protein-surfactant interactions and novel analytical methodologies, *ACS Symp. Ser.* **675**:206-222 (1997)
- Kameoka D., Masuzaki E., Ueda T. und Imoto T., Effect of buffer species on the unfolding and the aggregation of humanized IgG, *J. Biochem.* **142**:383-391 (2007)
- Kamila M.M., Mondal N., Ghosh L.K. und Gupta B.K., Multiunit floating drug delivery system of rosiglitazone maleate: development, characterization, statistical optimization of drug release and in vivo evaluation, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **10**:887-899 (2009)
- Kanai S., Liu J., Patapoff T.W. und Shire S.J., Reversible self-association of a concentrated monoclonal antibody solution mediated by Fab-Fab interaction that impacts solution viscosity, *J. Pharm. Sci.* **97**:4219-4227 (2008)
- Katakam M. und Banga A.K., Use of poloxamer polymers to stabilize recombinant human growth hormone against various processing stresses, *Pharm. Dev. Technol* **2**:143-149 (1997)
- Katakam M., Bell L.N. und Banga A.K., Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone, *J. Pharm. Sci.* **84**:713-716 (1995)

Kendrick B.S., Chang B.S., Arakawa T., Peterson B., Randolph T.W., Manning M.C. und Carpenter J.F., Preferential exclusion of sucrose from recombinant interleukin-1 receptor antagonist: role in restricted conformational mobility and compaction of native state, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:11917-11922 (1997)

Kerwin B.A., Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways, *J. Pharm. Sci.* **97**:2924-2935 (2007)

Kerwin B.A., Akers M.J., Apostol I., Moore-Einsel C., Etter J.E., Hess E., Lippincott J., Levine J., Mathews A.J., Revilla-Sharp P., Schubert R. und Looker D.L., Acute and long-term stability studies of deoxy hemoglobin and characterization of ascorbate-induced modifications, *J. Pharm. Sci.* **88**:79-88 (1999)

Kerwin B.A. und Remmele R.L., Jr., Protect from light: photodegradation and protein biologics, *J. Pharm. Sci.* **96**:1468-1479 (2007)

Kiese S., Pappengerger A., Friess W. und Mahler H.C., Shaken, not stirred: Mechanical stress testing of an IgG1 antibody, *J. Pharm. Sci.* **97**:4347-4366 (2008)

Klous M.G., Nuijen B., Van den Brink W., Van Ree J.M. und Beijnen J.H., Process characterisation, optimisation and validation of production of diacetylmorphine/caffeine sachets: a design of experiments approach, *Int. J. Pharm.* **285**:65-75 (2004)

Köhler G. und Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* **256**:495-497 (1975)

Kreilgaard L., Jones L.S., Randolph T.W., Frokjaer S., Flink J.M., Manning M.C. und Carpenter J.F., Effect of Tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XIII, *J. Pharm. Sci.* **87**:1597-1603 (1998)

Kueltzo L.A. und Middaugh C.R., Structural characterization of bovine granulocyte colony stimulating factor: Effect of temperature and pH, *J. Pharm. Sci.* **92**:1793-1804 (2007)

Lahlou A., Blanchet B., Carvalho M., Paul M. und Astier A., Mechanically-induced aggregation of the monoclonal antibody cetuximab, *Ann. Pharm. Fr.* **67**:340-352 (2009)

Liu D. und Lin P., Three-dimensional liquid sloshing in a tank with baffles, *Ocean. Eng.* **36**:202-212 (2009)

Liu H., Gaza-Bulseco G., Faldu D., Chumsae C. und Sun J., Heterogeneity of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* **97**:2426-2447 (2008a)

Liu H., Gaza-Bulseco G. und Sun J., Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **837**:35-43 (2006)

- Liu H., Gaza-Bulseco G., Xiang T. und Chumsae C., Structural effect of deglycosylation and methionine oxidation on a recombinant monoclonal antibody, *Mol. Immunol.* **45**:701-708 (2008b)
- Liu J., Nguyen M.D., Andya J.D. und Shire S.J., Reversible self-association increases the viscosity of a concentrated monoclonal antibody in aqueous solution, *J. Pharm. Sci.* **94**:1928-1940 (2005)
- Lougheed W.D., Albisser A.M., Martindale H.M., Chow J.C. und Clement J.R., Physical stability of insulin formulations, *Diabetes* **32**:424-432 (1983)
- Maa Y.F. und Hsu C.C., Investigation on fouling mechanisms for recombinant human growth hormone sterile filtration, *J. Pharm. Sci.* **87**:808-812 (1998)
- Maa Y.-F. und Hsu C.C., Effect of high shear on proteins, *Biotechnol. Bioeng.* **51**:458-465 (1996)
- Maa Y.-F. und Hsu C.C., Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface, *Biotechnol. Bioeng.* **54**:503-512 (1997)
- Mahler H.C., Protein Analytics, APV Seminar, Vortragsunterlagen: Analytical methods in the pharmacopeias used for protein analytics, Karlsruhe (2008)
- Mahler H.C., Muller R., Friess W., Delille A. und Matheus S., Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**:407-417 (2005a)
- Mahler H.C., Müller R., Friess W., Delille A. und Matheus S., Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**:407-417 (2005b)
- Mahler H.C., Printz M., Kopf R., Schuller R. und Muller R., Behaviour of polysorbate 20 during dialysis, concentration and filtration using membrane separation techniques, *J Pharm Sci* **97**:764-774 (2008)
- Mahler H.C., Senner F., Mäder K. und Müller R., Surface activity of a monoclonal antibody, *J. Pharm. Sci.* **98**:4525-4533 (2009)
- Manning M.C., Patel K. und Borchardt R.T., Stability of protein pharmaceuticals, *Pharm. Res.* **6**:903-918 (1989)
- Martin A.C.R. and Allen J., Bioinformatics tools for antibody engineering, in: Dübel, S., Handbook of therapeutic antibodies, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, 2007, 95-117
- Martin A.H., Grolle K., Bos M.A., Cohen Stuart M.A. und van Vliet T., Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability, *J. Colloid Interface Sci.* **254**:175-183 (2002)

- Martsev S.P., Tsybovsky Y.I., Stremovskiy O.A., Odintsov S.G., Balandin T.G., Arosio P., Kravchuk Z.I. und Deyev S.M., Fusion of the antiferritin antibody VL domain to barnase results in enhanced solubility and altered pH stability, *Protein Eng. Des. Sel.* **17**:85-93 (2004)
- Maruyama T., Katoh S., Nakajima M., Nabetani H., Abbott T.P., Shono A. und Satoh K., FT-IR analysis of BSA fouled on ultrafiltration and microfiltration membranes, *J. Membr. Sci.* **192**:201-207 (2001a)
- Maruyama T., Katoh S., Nakajima M. und Nabetani H., Mechanism of bovine serum albumin aggregation during ultrafiltration, *Biotechnol. Bioeng.* **75**:233-238 (2001b)
- Matheus S., Friess W. und Mahler H.C., FTIR and nDSC as analytical tools for high-concentration protein formulations, *Pharm. Res.* **23**:1350-1363 (2006a)
- Matheus S., Friess W., Schwartz D. und Mahler H.C., Liquid high concentration IgG1 antibody formulations by precipitation, *J. Pharm. Sci.* **59**:407-417 (2008)
- Matheus S., Mahler H.C. und Friess W., A critical evaluation of T_m (FTIR) measurements of high-concentration IgG1 antibody formulations as a formulation development tool, *Pharm. Res.* **23**:1617-1627 (2006b)
- Merck Serono, The World of Oncology: Combination is key, *Fact Sheets* 9-11 (2003)
- Messa C., Russo F., Caruso M.G. und Di Leo A., EGF, TGF- α , and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma, *Acta Oncol.* **37**:285-289 (1998)
- Millipore Produktübersicht: Amicon Rührzelle, [www. Millipore.com](http://www.millipore.com), <http://www.millipore.com/catalogue/module/c3259>, vom 19.01.2010, (2010)
- Millipore Produktübersicht: Amicon Zentrifugalkonzentratoren, [www. Millipore.com](http://www.millipore.com), <http://www.millipore.com/searchsummary.do?tabValue=&q=Amicon>, vom 19.01.2010, (2010)
- Motwani S.K., Chopra S., Talegaonkar S., Kohli K., Ahmad F.J. und Khar R.K., Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterisation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**:513-525 (2008)
- Naramura M., Gillies S.D., Mendelsohn J., Reisfeld R.A. und Müller B.M., Therapeutic potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastasis model for human melanoma, *Cancer Immunol. Immunother.* **37**:343-349 (1993)
- Nayar R. und Manning M.C., High throughput formulation: Strategies for rapid development of stable protein products, in: Carpenter J.F., Manning M.C., Rational design of stable protein formulations, *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, 2002, 177-198

- Nerurka M., Ho N.F.H., Burton P., Vidmar T. und Borchardt R.T., Mechanistic roles of neutral surfactants on concurrent polarized and passive membrane transport of a model peptide in caco-2 cells, *J. Pharm. Sci.* **86**:813-821 (1997)
- Nguyen L.T., Wiencek J.M. und Kirsch L.E., Characterization methods for the physical stability of biopharmaceuticals, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **57**:429-445 (2003)
- Oberg A.L. und Vitek O., Statistical design of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments, *J. Proteom Res.* **8**:2144-2156 (2009)
- Ogunbenro K., Dokoumetzidis A. und Aarons L., Application of optimal design methodologies in clinical pharmacology experiments, *Pharm. Res.* **8**:239-252 (2009)
- Oliva A., Santovena A., Farina J. und Llabrés M., Effect of high shear rate on stability of proteins: kinetic study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33**:145-155 (2003)
- Ortega-Vinuesa J.L., Tengvall P. und Lundström I., I, Aggregation of HSA, IgG, and fibrinogen on methylated silicon surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* **207**:228-239 (1998)
- Paborji M., Pochopin N.L., Coppola W.P. und Bogardus J.B., Chemical and physical stability of chimeric L6, a mouse-human monoclonal antibody, *Pharm. Res.* **11**:764-771 (1994)
- Panigrahy P.K., Saha U.K. und Maity D., Experimental studies on sloshing behavior due to horizontal movement of liquids in baffled tanks, *Ocean Eng.* **36**:213-222 (2009)
- Parkins D.A. und Lashmar U.T., The formulation of biopharmaceutical products, *Pharm. Sci. Technol. Today* **3**:129-137 (2000)
- Patapoff T.W. und Esue O., Polysorbate 20 prevents the precipitation of a monoclonal antibody during shear, *Pharm. Dev. Technol* **14**:659-664 (2009)
- Patro S.Y., Freund E. und Chang B.S., Protein formulation and fill-finish operations, *Biotechnol. Ann. Rev.* **8**:55-84 (2002)
- Pavlou A.K. und Belsey M.J., The therapeutic antibodies market to 2008, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**:389-396 (2005)
- Penichet M.L. und Morrisio S.L., Design and engineering human forms of monoclonal antibodies, *Drug Development Research* **61**:121-136 (2004)
- Persson K.M. und Gekas V., Factors influencing aggregation of macromolecules in solution, *Process Biochem.* **29**:89-98 (1994)
- Peters B. und Trout B.L., Asparagine deamidation: pH-dependent mechanism from density functional theory, *Biochemistry* **45**:5384-5392 (2006)

Petersen H., Grundlagen der statistischen Versuchsplanung, Band 2: Grundlagen der Statistik und der statistischen Versuchsplanung, *ecomед verlagsgesellschaft mbH*, Landsberg, 1991

Phillips A.T. und Signs M.W., Desalting, concentration, and buffer exchange by dialysis and ultrafiltration, *Curr. Protoc. Protein Sci.* 4.4.1-4.4.15 (2004)

Philo J.S., Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types?, *AAPS J.* **8**:E564-E571 (2006)

Pohl T., Concentration of proteins and removal of solutes, *Methods Enzymol.* **182**:68-83 (1990)

Popov G., Sankar S., Sankar T.S. und Vatishtas V.H., Liquid sloshing in rectangular road containers, *Comput. Fluids.* **21**:551-569 (1992)

Qi X.L., Brownlow S., Holt C. und Sellers P., Thermal denaturation of [beta]-lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05, *Biochim. Biophys. Acta* **1248**:43-49 (1995)

Rebouillat S. und Liksonov D., Fluid-structure interaction in partially filled liquid containers: A comparative review of numerical approaches, *Comput. Fluids* **39**:739-746 (2010)

Reubsaet J.L., Beijnen J.H., Bult A., van Maanen R.J., Marchal J.A. und Underberg W.J., Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**:955-978 (1998a)

Reubsaet J.L., Beijnen J.H., Bult A., van Maanen R.J., Marchal J.A.D. und Underberg W.J.M., Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: physical instability, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**:979-984 (1998b)

Rezaei-Ghaleh N., Ebrahim-Habibi A., Moosavi-Movahedi A.A. und Nemat-Gorgani M., Effect of polyamines on the structure, thermal stability and 2,2,2-trifluoroethanol-induced aggregation of alpha-chymotrypsin, *Int. J. Biol. Macromol.* **41**:597-604 (2007)

Rosenberg E., Hepbildikler S., Kuhne W. und Winter G., Ultrafiltration concentration of monoclonal antibody solutions: Development of an optimized method minimizing aggregation, *J. Membr. Sci.* **342**:50-59 (2009)

Roy S., Mason B.D., Schöneich C.S., Carpenter J.F., Boone T.C. und Kerwin B.A., Light-induced aggregation of type I soluble tumor necrosis factor receptor, *J. Pharm. Sci.* **98**:3182-3199 (2009)

Rubin D. und Christy C., Selecting the right ultrafiltration membrane for biopharmaceutical applications, *Pharm. Dev. Technol* 41-45 (2002)

- Russell B.J., Velez J.O., Laven J.J., Johnson A.J., Chang G.J. und Johnson B.W., A comparison of concentration methods applied to non-infectious flavivirus recombinant antigens for use in diagnostic serological assays, *J. Virol. Methods* **145**:62-70 (2007)
- Ryan M.E., Webster M.L. und Statler J.D., Adverse effects of intravenous immunoglobulin therapy, *Clin. Pediatr.* **35**:23-31 (1996)
- Salinas B.A., Sathish H.A., Bishop S.M., Harn N., Carpenter J.F. und Randolph T.W., Understanding and modulating opalescence and viscosity in a monoclonal antibody formulation, *J. Pharm. Sci.* **99**:82-93 (2010)
- Salnikova M.S., Middaugh C.R. und Rytting J.H., Stability of lyophilized human growth hormone, *Int. J. Pharm.* **358**:108-113 (2008)
- Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F. und Normanno N., Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **19**:183-232 (1995)
- Saluja A., Badkar A.V., Zeng D.L. und Kalonia D.S., Ultrasonic rheology of a monoclonal antibody (IgG2) solution: implications for physical stability of proteins in high concentration formulations, *J. Pharm. Sci.* **96**:3181-3195 (2007)
- Saluja A., Badkar A.V., Zeng D.L., Nema S. und Kalonia D.S., Application of high-frequency rheology measurements for analyzing protein-protein interactions in high protein concentration solutions using a model monoclonal antibody (IgG2), *J. Pharm. Sci.* **95**:1967-1983 (2006)
- Saluja A. und Kalonia D.S., Nature and consequences of protein-protein interactions in high protein concentration solutions, *Int. J. Pharm.* **358**:1-15 (2008)
- Sanz L., Blanco B. und Alvarez-Vallina L., Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks, *Trends Immunol.* **25**:85-91 (2004)
- Saul A. und Don M., A rapid method of concentrating proteins in small volumes with high recovery using Sephadex G-25, *Anal. Biochem.* **138**:451-453 (1984)
- Saxena A., Tripathi B.P., Kumar M. und Shahi V.K., Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview, *Adv. Colloid Interface Sci.* **145**:1-22 (2009)
- Scheffler E., Statistische Versuchsplanung und Auswertung; Eine Einführung für Praktiker, *Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie*, 3. Auflage, Stuttgart, 1997
- Schellekens H., Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins, *Nephrol. Dial. Transplant.* **20**:3-9 (2005)

Selwyn M.R., Principles of experimental design for the life science, *CRC-Press*, Boca Raton, 1996

Serno T., Carpenter J.F., Randolph T.W. und Winter G., Inhibition of agitation-induced aggregation of an IgG-antibody by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, *J. Pharm. Sci.* **99**:1193-1206 (2010)

Sharma D.K., King D., Moore P., Oma P. und Thomas D., Flow microscopy for particulate analysis in parenteral and pharmaceutical fluids, *Eur. J. Parenteral Pharm. Sci.* **12**:97-101 (2007)

Shekari M.R., Khaji N. und Ahmadi M.T., A coupled BE-FE study for evaluation of seismically isolated cylindrical liquid storage tanks considering fluid-structure interaction., *J. Fluids Struct.* **25**:567-585 (2009)

Shire S.J., Shakrokh Z. und Liu J., Challenges in the development of high protein concentration formulations, *J. Pharm. Sci.* **93**:1390-1402 (2004)

Singh B., Dahiya M., Saharan V. und Abuja N., Optimizing drug delivery systems using systematic "design of experiments." Part II: retrospect and prospects, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **22**:215-294 (2005a)

Singh B., Kumar R. und Abuja N., Optimizing drug delivery systems using systematic "design of experiments." Part I: fundamental aspects, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **22**:27-105 (2005b)

Sluzky V., Klibanov A.M. und Langer R., Mechanism of insulin aggregation and stabilization in agitated aqueous solutions, *Biotechnol. Bioeng.* **40**:895-903 (1992)

Sluzky V., Tamada J.A., Klibanov A.M. und Langer R., Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:9377-9381 (1991)

Sukumar M., Doyle B.L., Combs J. und Pekar A.H., Opalescent appearance of an IgG1 antibody at high concentrations and its relationship to noncovalent association, *Pharm. Res.* **21**:1087-1093 (2004)

Szenczi A., Kardos J., Medgyesi G.A. und Zavodszky P., The effect of solvent environment on the conformation and stability of human polyclonal IgG in solution, *Biologicals* **34**:5-14 (2006)

Thirumangalathu R., Krishnan S., Ricci M.S., Brems D.N., Randolph T.W. und Carpenter J.F., Silicone oil- and agitation-induced aggregation of a monoclonal antibody in aqueous solution, *J. Pharm. Sci.* **98**:3167-3181 (2009)

- Timasheff N., The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**:67-97 (1993)
- Treuheit M.J., Kosky A.A. und Brems D.N., Inverse relationship of protein concentration and aggregation, *Pharm. Res.* **19**:511-516 (2002)
- Tyagi A.K., Randolph T.W., Dong A., Maloney K.M., Hitscherich C., Jr. und Carpenter J.F., IgG particle formation during filling pump operation: a case study of heterogeneous nucleation on stainless steel nanoparticles, *J. Pharm. Sci.* **98**:94-104 (2009)
- Tye H., Application of statistical design of experiments methods in drug discovery, *Drug Discovery Today* **9**:485-486 (2004)
- Usami A., Ohtsu A., Takahama S. und Fujii T., The effect of pH, hydrogen peroxide and temperature on the stability of human monoclonal antibody, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**:1133-1140 (1996)
- Uversky V.N., Li J. und Fink A.L., Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation, *Journal of Biological Chemistry* **276**:10737-10744 (2001)
- Vakos H.T., Kaplan H., Black B., Dawson B. und Hefford M.A., Use of the pH memory effect in lyophilized proteins to achieve preferential methylation of alpha-amino groups, *J. Protein Chem.* **19**:231-237 (2000)
- Virella J.C., Godoy L.A. und Suárez L.E., Fundamental modes of tank-liquid systems under horizontal motions, *Eng. Struct.* **28**:1450-1461 (2006)
- Volkin D.B. und Middaugh C.R., The characterization, stabilization, and formulation of acidic fibroblast growth factor, *Pharm. Biotechnol.* **9**:181-217 (1996)
- Wang L., Sun X. und Ghosh R., Purification of equine IgG using membrane based enhanced hybrid bioseparation technique: a potential method for manufacturing hyperimmune antibody, *Biotechnol. Bioeng.* **99**:625-633 (2008a)
- Wang W., Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* **203**:1-60 (2000)
- Wang W., Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* **185**:129-188 (1999)
- Wang W., Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, *Int. J. Pharm.* **289**:1-30 (2005)
- Wang W., Singh S., Zeng D.L., King K. und Nema S., Antibody structure, instability, and formulation, *J. Pharm. Sci.* **96**:1-26 (2007)

Wang W., Wang Y.J. und Wang D.Q., Dual effects of Tween 80 on protein stability, *Int. J. Pharm.* **347**:31-38 (2008b)

Webb J.N., Webb S.D., Cleland J.L., Carpenter J.F. und Randolph T.W., Partial molar volume, surface area, and hydration changes for equilibrium unfolding and formation of aggregation transition state: high-pressure and cosolute studies on recombinant human IFN-gamma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:7259-7264 (2001)

Webb S.D., Cleland J.L., Carpenter J.F. und Randolph T.W., A new mechanism for decreasing aggregation of recombinant human interferon-gamma by a surfactant: slowed dissolution of lyophilized formulations in a solution containing 0.03% polysorbate 20, *J. Pharm. Sci.* **91**:543-558 (2002a)

Webb S.D., Golledge S.L., Cleland J.L., Carpenter J.F. und Randolph T.W., Surface adsorption of recombinant human interferon-gamma in lyophilized and spray-lyophilized formulations., *J. Pharm. Sci.* **91**:1474-1487 (2002b)

Wember T., Technische Statistik und statistische Versuchsplanung, Version 8.4 (Unterlagen zur Fortbildung), *Training & Coaching*, 2009 (Theo.Wember@Versuchsplanung.de)

Zhang J., Peng X., Jonas A. und Jonas J., NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A, *Biochemistry* **34**:8631-8641 (1995)

Zhang W. und Czupryn M.J., Free sulfhydryl in recombinant monoclonal antibodies, *Biotechnol. Prog.* **18**:509-513 (2002)

Zheng J.Y. und Janis L.J., Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298, *Int. J. Pharm.* **308**:46-51 (2006)

Zimmer A., Galenische Formulierung rekombinanter Wirkstoffe, *Pharm. Unserer Zeit* **32**:384-389 (2003)

Anhang

A1 Trübungsmessungen an Formazin-Standardlösungen

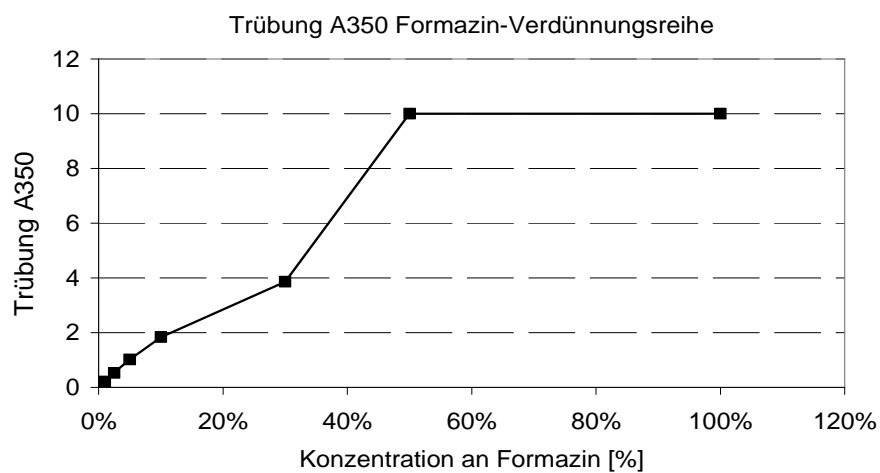
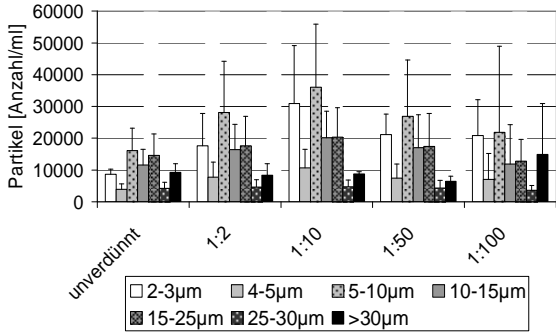
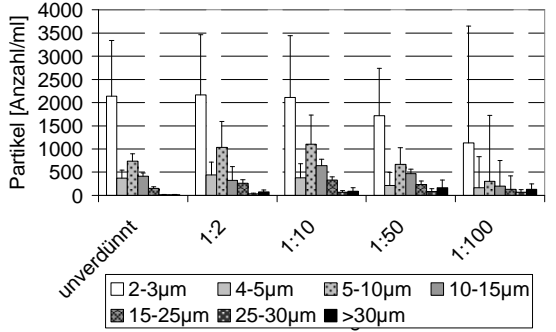
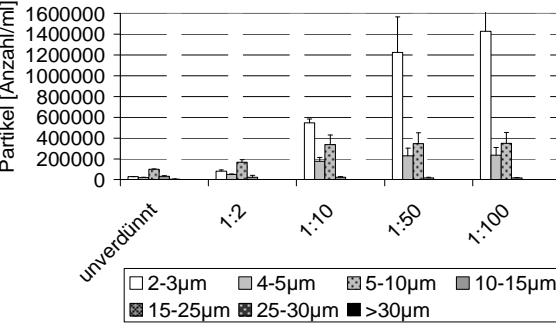
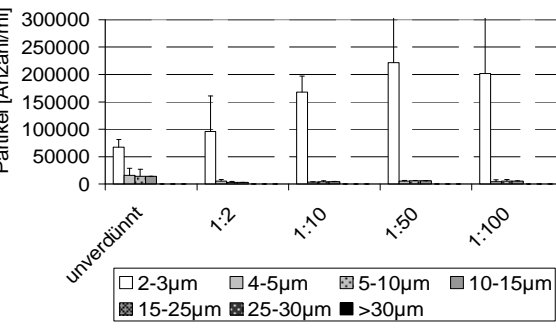
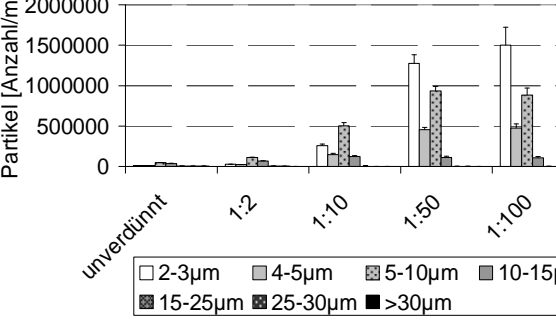
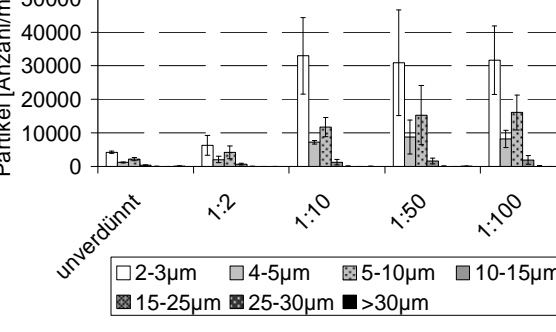


Abbildung A.1 Mit Hilfe des Formazin-Standards wurde die Trübung nach der Vorschrift der Ph.Eur. 2.2.1 [Europäisches Arzneibuch 6.0 2008a] anhand einer Verdünnungsreihe am UV/VIS-Gerät Cary 50 bestimmt. Bis zu einer Absorption von ca. 2 sind die Werte annähernd linear und proportional zur Konzentration.

A2 Lichtblockademessungen

Tabelle A.2 Evaluierung der Lichtblockade: Da im Lichtblockade-Gerät (PAMAS) keine stark partikelreichen (aggregatreiche) Lösungen auflösbar sind, wurden verschiedene Verdünnungen von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (5 mg/ml) mit und ohne 0,01% Tween 80 gemessen, bis kein weiterer Verdünnungseffekt zu sehen war (das bedeutet: bis die kleinen Aggregate (2-3 µm) im Vergleich der verschiedenen Verdünnungen die größte Anzahl aufwiesen und durch weiteres Verdünnen die Anzahl nicht erheblich stieg). Die Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungen wurden alle auf die ursprüngliche Konzentration zurückgerechnet und hier verglichen (Grafiken beziehen sich auf Ausgangslösung), um zu sehen, welche Verdünnung für den Versuch gewählt werden sollte (gewählte Verdünnung für den Versuch (Kap. 2.2) ist jeweils unter der Grafik angegeben). Placebo-PBS wurde ebenfalls gemessen und zuvor von den Ergebnissen abgezogen.

PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung (pH 7,2); 5 mg/ml	PBS-gepufferte Cetuximab-Lösung (pH 7,2); 5 mg/ml; 0,01% Tween 80
Nach 48 h Begasen	
	
→Verdünnung 1:10 wurde verwendet (Kap. 4.4)	→Verdünnung 1:10 wurde verwendet (Kap. 4.4)
Nach 48 h Rühren	
	
→Verdünnung 1:100 wurde verwendet (Kap. 4.4)	→Verdünnung 1:50 wurde verwendet (Kap. 4.4)
Nach 48 h Schütteln	
	
→Verdünnung 1:50 wurde verwendet (Kap. 4.4)	→Verdünnung 1:10 wurde verwendet (Kap. 4.4)

Lichtblockade-Ergebnisse aus Kapitel 4.3.3

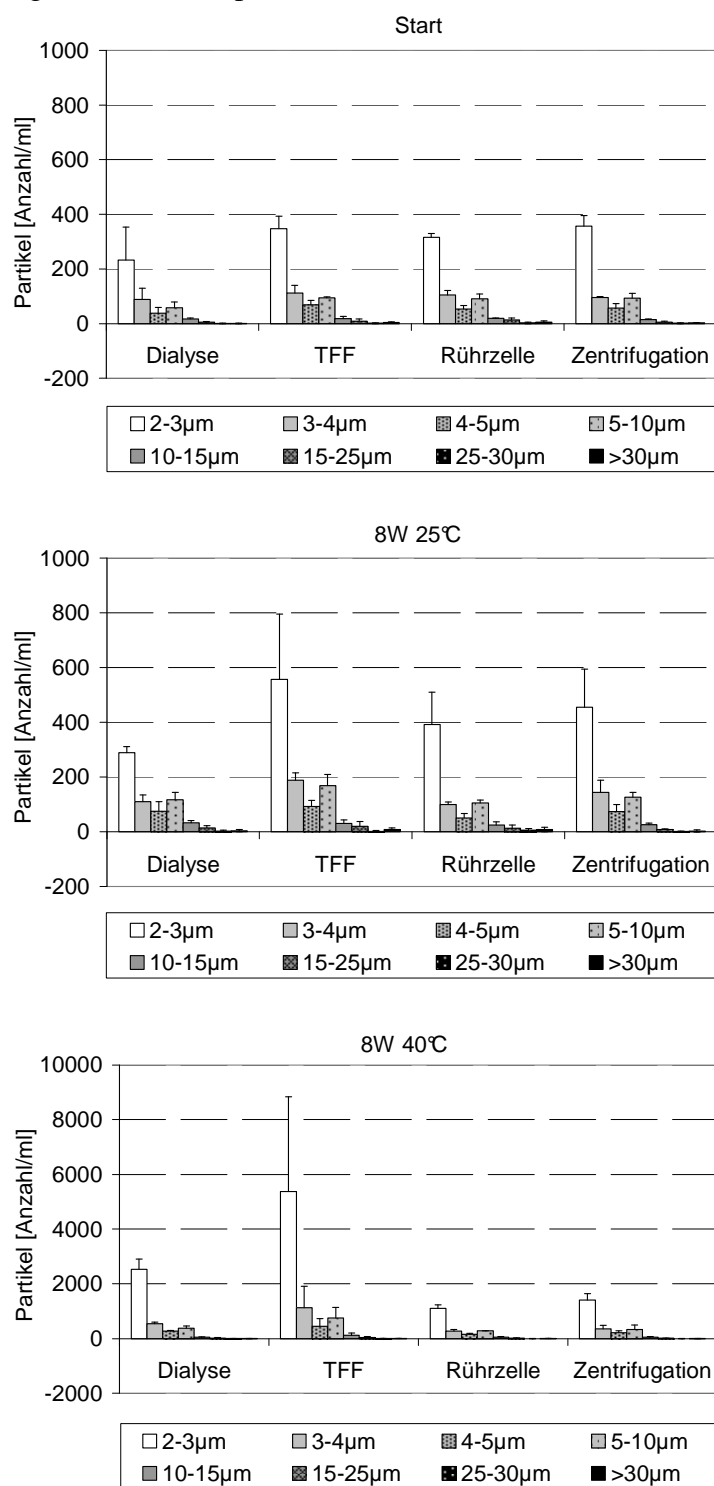


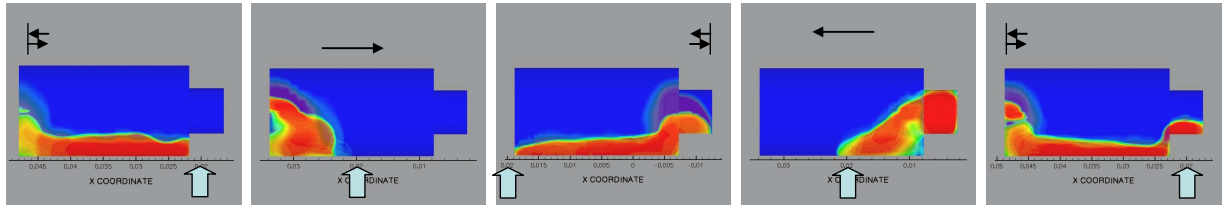
Abbildung A.2 PAMAS-Ergebnisse von PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung mit 100 mg/ml (pH 7,2) nach Aufkonzentrierung mit verschiedenen Techniken, nach 0 und 8 Wochen Einlagerung (25°C und 40°C) gemessen

A3 Simulation und Hochgeschwindigkeitsaufnahmen

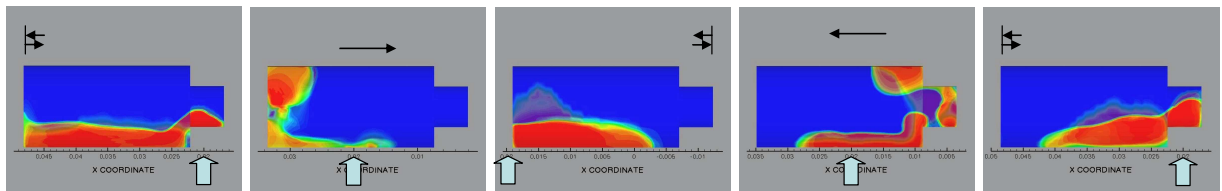
Schüttelgeschwindigkeiten im Vergleich

Tabelle A.3.1 Simulations- und Hochgeschwindigkeitsaufnahmen für verschiedene Geschwindigkeiten im Vergleich (nach „Einpendeln“ der Flüssigkeits-Bewegung)

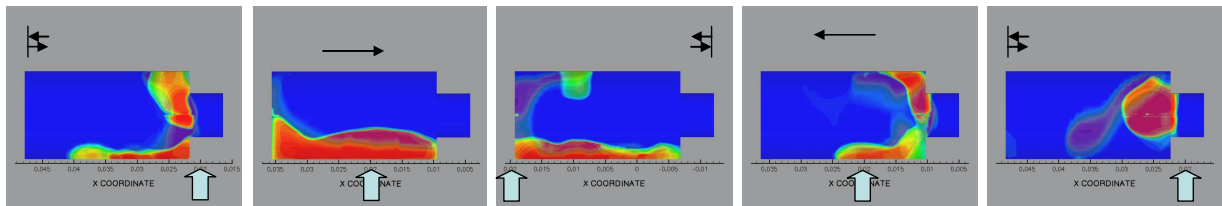
Simulation: 150 U/min; 1 ml; 2 ml-Vial; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



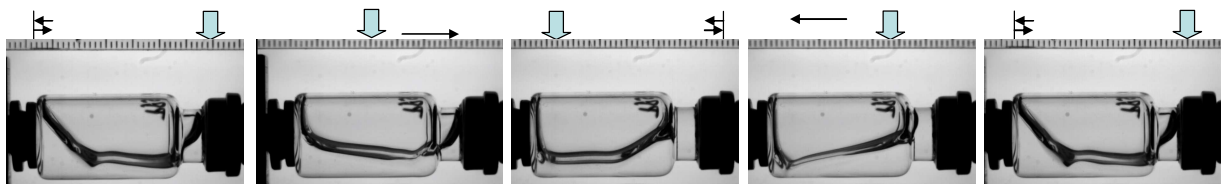
Simulation: 200 U/min; 1 ml; 2 ml-Vial; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



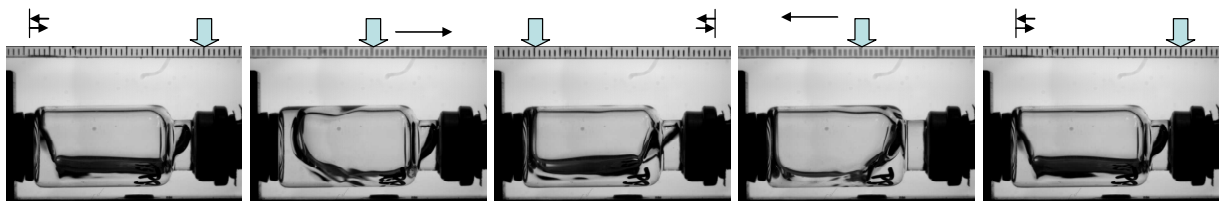
Simulation: 250 U/min; 1 ml; 2 ml-Vial; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



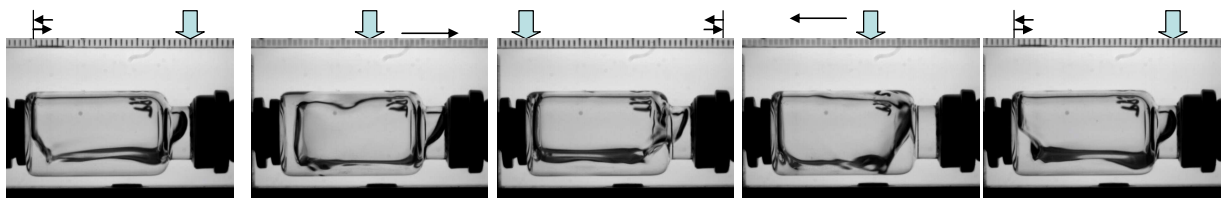
Hochgeschwindigkeitsaufnahmen: 150 U/min; 1 ml; 2 ml-Vial; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



Hochgeschwindigkeitsaufnahmen: 200 U/min; 1 ml; 2 ml-Vial; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



Hochgeschwindigkeitsaufnahmen: 250 U/min; 1 ml; 2 ml-Vial; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



Ergebnisgrößen der Simulation während eines Schüttelvorgangs

1. Scherkraft

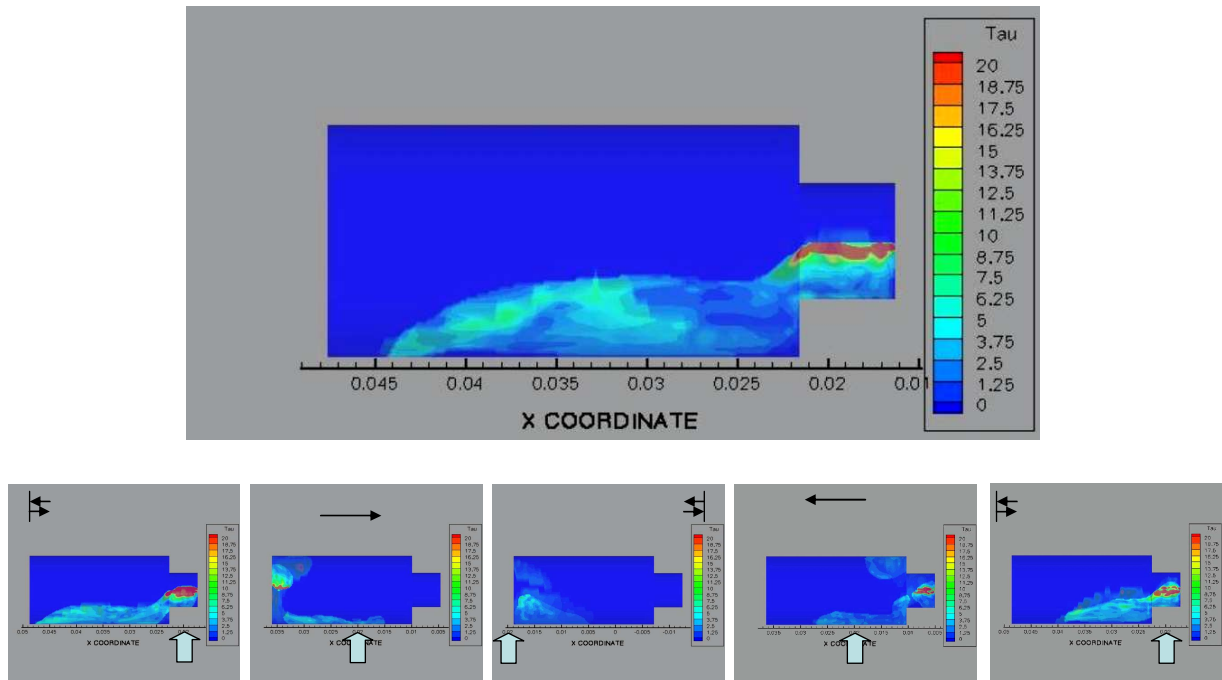


Abbildung A.3.1 Scherkraft-Verteilung während einer Schüttelbewegung von einem 2 ml-Vial mit 1 ml PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (5 mg/ml; pH 7,2) bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 U/min (Skala seitlich der kleinen Bilder entspricht der auf dem großen Bild)

2. Druck

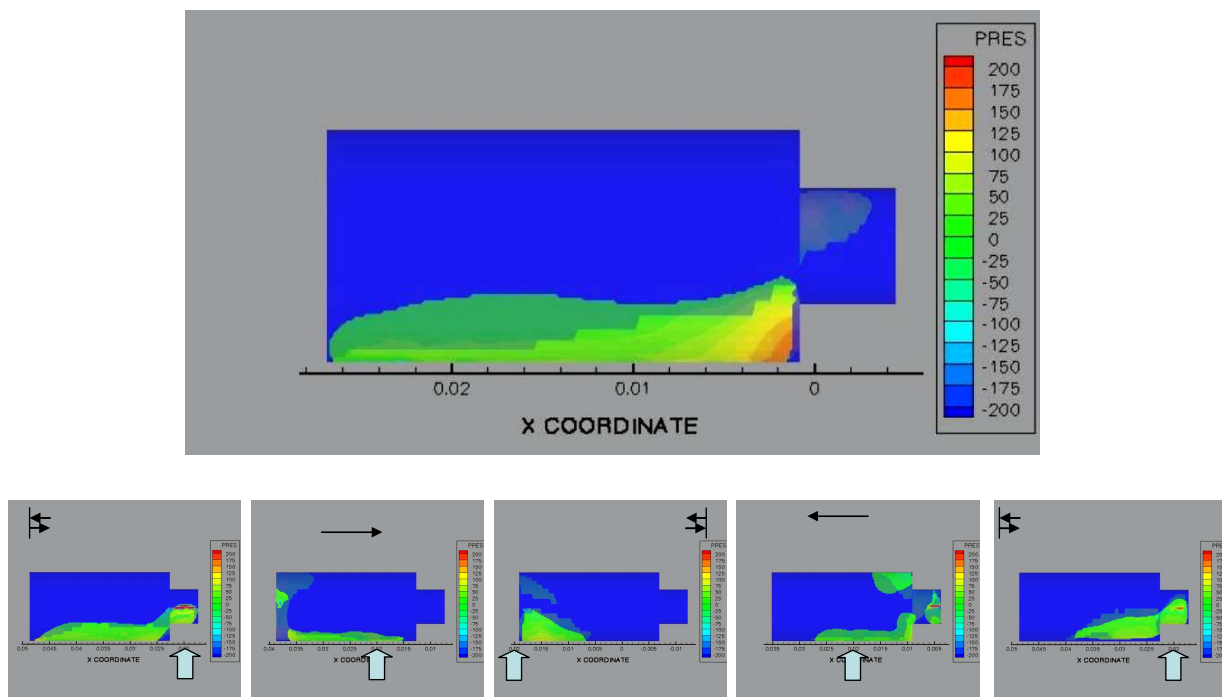


Abbildung A.3.2 Druck-Verteilung während einer Schüttelbewegung von einem 2 ml-Vial mit 1 ml PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (5 mg/ml; pH 7,2) bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 U/min (Skala seitlich der kleinen Bilder entspricht der auf dem großen Bild)

3. Geschwindigkeit

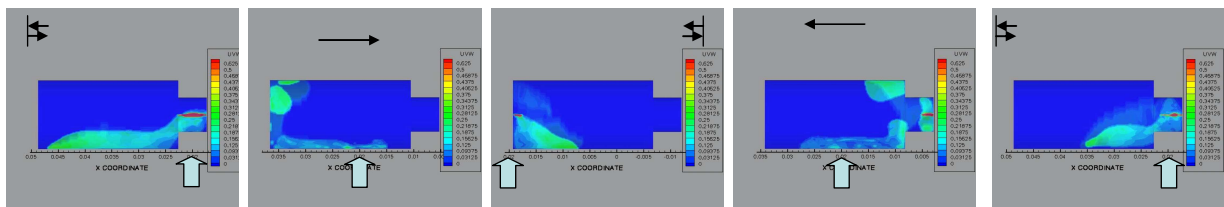
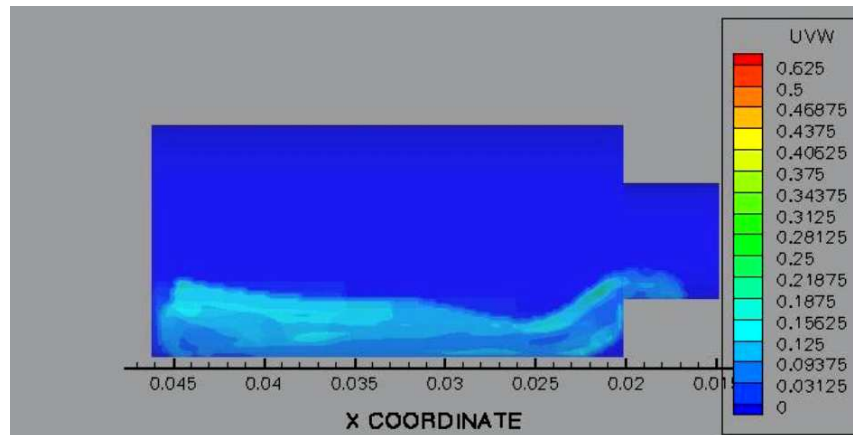
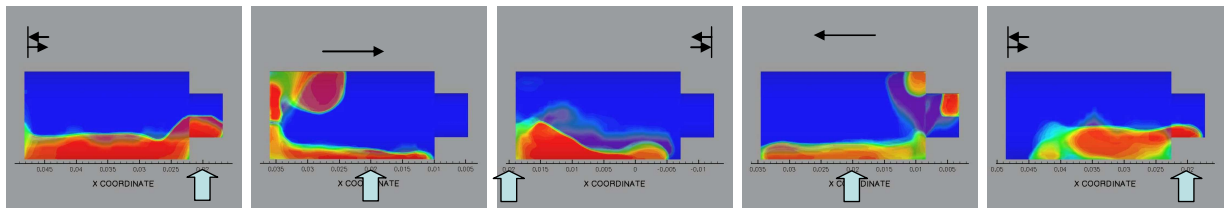


Abbildung A.3.3 Geschwindigkeits-Verteilung während einer Schüttelbewegung von einem 2 ml-Vial mit 1 ml PBS-gepufferter Cetuximab-Lösung (5 mg/ml; pH 7,2) bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 U/min (Skala seitlich der kleinen Bilder entspricht der auf dem großen Bild)

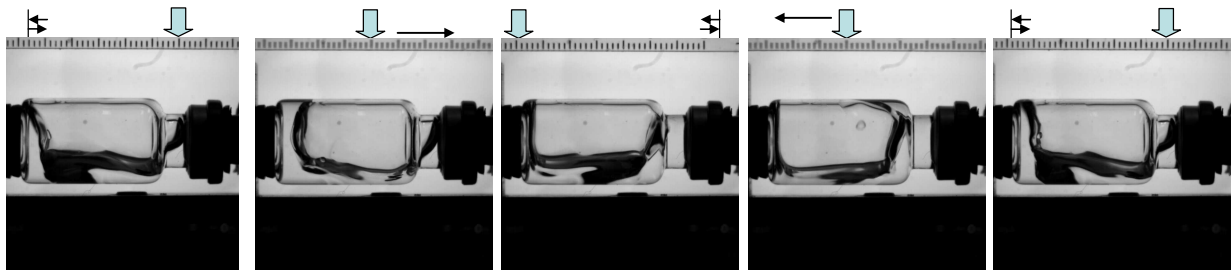
Marktformulierung

Tabelle A.3.2 Vergleich von Simulations- und Hochgeschwindigkeitsaufnahmen der Marktformulierung (geschüttelt bei 200 U/min mit 1 ml im 2 ml-Vial)

1. Simulation von Cetuximab-Marktformulierung



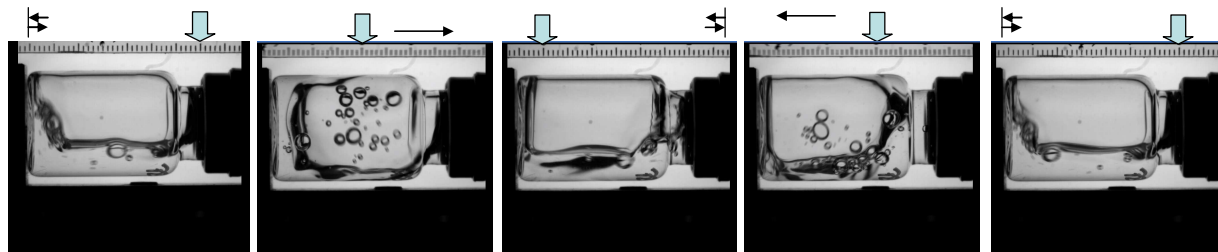
2. Hochgeschwindigkeitsbilder von Cetuximab-Marktformulierung



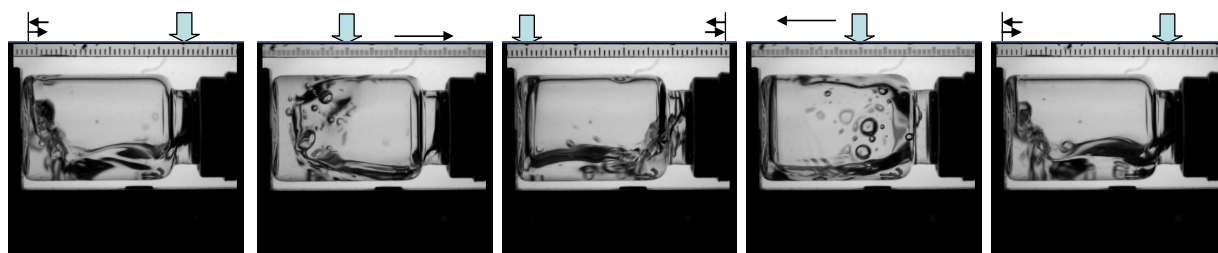
Vialgröße

Tabelle A.3.3 Hochgeschwindigkeitsaufnahmen von 6 ml-Vials im Vergleich zu 2 ml-Vials bei 200 und 250 U/min

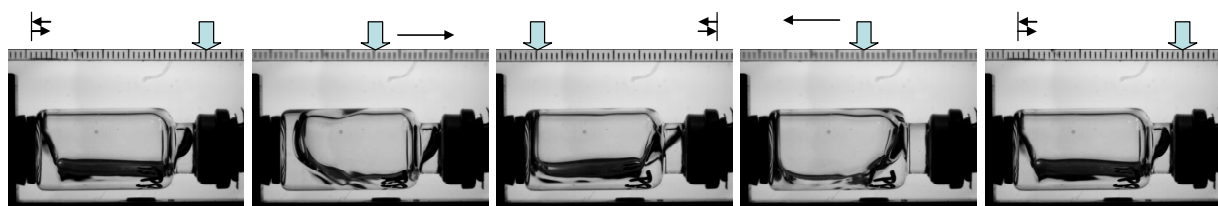
6 ml-Vials 200 U/min; 3 ml; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



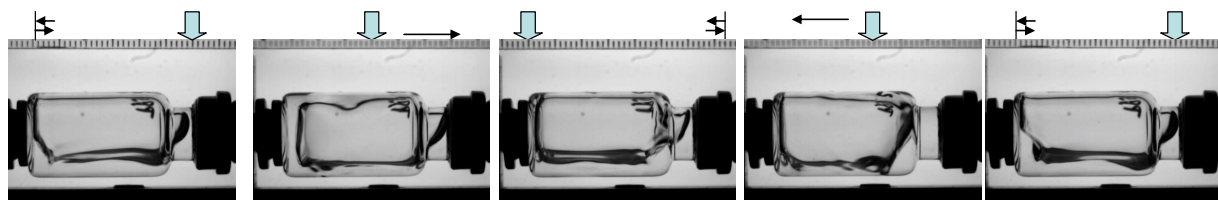
6 ml-Vials 250 U/min; 3 ml; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



2 ml-Vials 200 U/min; 1 ml; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



2 ml-Vials 250 U/min; 1 ml; Cetuximab in PBS (5 mg/ml; pH 7,2)



A4 Anteil löslicher Aggregate (ausgewählte Ergebnisse)

Tabelle A.4 Der Gehalt an löslichen Aggregaten in Prozent ist als Mittelwert aus Triplets nach Schüttel- und Rührstressversuchen (Werte mittels SEC bestimmt) dargestellt.

Stressbe- dingung	Stress- zeit	Markt- form./ PBS	Aggre- gat- gehalt [%]	Stand- ard- abwei- chung	Stressbe- dingung	Stress- zeit	Markt- form./ PBS	Aggre- gat- gehalt [%]	Stand- ard- abwei- chung
Schüttel- stress	Start	PBS	0,213	0,00	Schüttel- stress	Start	Marktform.	0,158	0,01
	5 h	PBS	0,210	0,00		5 h	Marktform.	0,153	0,01
(200 U/min; 0,5 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	PBS	0,224	0,02	(200 U/min; 3 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	Marktform.	0,141	0,01
	48 h	PBS	0,195	0,01		48 h	Marktform.	0,133	0,00
	120h	PBS	0,642	0,61		120h	Marktform.	0,111	0,01
Schüttel- stress	Start	PBS	0,213	0,00	Schüttel- stress	Start	PBS	0,218	0,00
	5 h	PBS	0,220	0,01		5 h	PBS	0,165	0,00
(200 U/min; 0,7 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	PBS	0,246	0,01	(250 U/min; 3 ml ; 6 ml Vial; RT	24 h	PBS	0,147	0,01
	48 h	PBS	0,236	0,01		48 h	PBS	0,058	0,08
	120h	PBS	0,403	0,08		120h	PBS	0,000	0,00
Schüttel- stress	Start	PBS	0,213	0,00	Schüttel- stress	Start	PBS	0,218	0,00
	5 h	PBS	0,301	0,04		5 h	PBS	0,513	0,07
(200 U/min; 1 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	PBS	0,283	0,06	(250 U/min; 3 ml ; 1,5 ml Vial; RT	24 h	PBS	0,994	0,24
	48 h	PBS	0,407	0,19		48 h	PBS	2,418	0,16
	120h	PBS	1,113	0,90		120h	PBS	3,282	2,09
Schüttel- stress	Start	PBS	0,213	0,00	Schüttel- stress	Start	PBS	0,218	0,00
	5 h	PBS	0,214	0,01		5 h	PBS	0,298	0,02
(200 U/min; 2 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	PBS	0,215	0,03	(250 U/min; 3 ml ; 0,8 ml Vial; RT	24 h	PBS	1,986	0,83
	48 h	PBS	0,185	0,02		48 h	PBS	3,530	3,78
	120h	PBS	0,220	0,03		120h	PBS	7,073	6,51
Schüttel- stress	Start	PBS	0,213	0,00	Schüttel- stress	Start	PBS	0,253	0,01
	5 h	PBS	0,218	0,01		5 h	PBS	0,237	0,00
(200 U/min; 3 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	PBS	0,202	0,00	(200 U/min; 1 ml ; 2 ml Vial; 40°C	24 h	PBS	0,255	0,03
	48 h	PBS	0,173	0,00		48 h	PBS	0,240	0,01
	120h	PBS	0,322	0,13		120h	PBS	0,291	0,03
Schüttel- stress	Start	Marktform.	0,158	0,01	Schüttel- stress	Start	Marktform.	0,128	0,00
	5 h	Marktform.	0,154	0,00		5 h	Marktform.	0,134	0,01
(200 U/min; 0,5 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	Marktform.	0,150	0,01	(200 U/min; 1 ml ; 2 ml Vial; 40°C	24 h	Marktform.	0,127	0,01
	48 h	Marktform.	0,149	0,02		48 h	Marktform.	0,131	0,01
	120h	Marktform.	0,063	0,06		120h	Marktform.	0,155	0,01
Schüttel- stress	Start	Marktform.	0,158	0,01	Schüttel- stress	Start	PBS	0,249	0,00
	5 h	Marktform.	0,154	0,00		5 h	PBS	0,227	0,01
(200 U/min; 0,7 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	Marktform.	0,144	0,02	(200 U/min; 1 ml ; 2 ml Vial; KS	24 h	PBS	0,210	0,01
	48 h	Marktform.	0,135	0,01		48 h	PBS	0,219	0,01
	120h	Marktform.	0,062	0,05		120h	PBS	0,236	0,01
Schüttel- stress	Start	Marktform.	0,158	0,01	Schüttel- stress	Start	Marktform.	0,139	0,01
	5 h	Marktform.	0,156	0,00		5 h	Marktform.	0,133	0,01
(200 U/min; 1 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	Marktform.	0,144	0,00	(200 U/min; 1 ml ; 2 ml Vial; KS	24 h	Marktform.	0,112	0,03
	48 h	Marktform.	0,143	0,00		48 h	Marktform.	0,126	0,01
	120h	Marktform.	0,127	0,01		120h	Marktform.	0,133	0,01
Schüttel- stress	Start	Marktform.	0,158	0,01					
	5 h	Marktform.	0,162	0,00					
(200 U/min; 2 ml ; 2 ml Vial; RT	24 h	Marktform.	0,142	0,00					
	48 h	Marktform.	0,316	0,04					
	120h	Marktform.	1,217	0,57					

Stressbe- dingung	Stress- zeit	Marktform. / PBS	Aggre- gat- gehalt [%]	Stand- ard- abwei- chung
Rührstress (160 U/min; 1000 µl; 2 ml Vial; RT)	Start	Marktform.	0,130	0,02
	5 h	Marktform.	0,146	0,03
	24 h	Marktform.	0,135	0,02
	48 h	Marktform.	0,259	0,02
	Start	PBS	0,167	0,01
	5 h	PBS	0,192	0,01
	24 h	PBS	0,121	0,03
	48 h	PBS	0,162	0,01
	Start	Marktform.	0,138	0,01
	5 h	Marktform.	0,124	0,02
Rührstress (100 U/min; 1000 µl; 2 ml Vial; RT)	24 h	Marktform.	0,122	0,09
	48 h	Marktform.	0,211	0,02
	120 h	Marktform.	0,263	0,16
	Start	PBS	0,250	0,01
	5 h	PBS	0,214	0,01
	24 h	PBS	0,180	0,02
	48 h	PBS	0,160	0,00
	120 h	PBS	0,198	0,02
	Start	Marktform.	0,125	0,01
	5 h	Marktform.	0,124	0,08
Rührstress (100 U/min; 500 µl; 2 ml Vial; RT)	24 h	Marktform.	0,368	0,29
	48 h	Marktform.	0,323	0,08
	120 h	Marktform.	2,409	3,75
	Start	PBS	0,302	0,01
	5 h	PBS	0,285	0,03
	24 h	PBS	0,196	0,01
	48 h	PBS	0,177	0,02
	120 h	PBS	0,184	0,01
	Start	Marktform.	0,125	0,01
	5 h	Marktform.	0,124	0,08

Stressbe- dingung	Stress- zeit	Marktform. / PBS	Aggre- gat- gehalt [%]	Stand- ard- abwei- chung
Rührstress (100 U/min; 120 h 750 µl; 2 ml Vial; RT)	Start	Marktform.	0,125	0,01
	5 h	Marktform.	0,129	0,01
	24 h	Marktform.	0,170	0,01
	48 h	Marktform.	0,166	0,04
	120 h	Marktform.	0,210	0,01
	Start	PBS	0,302	0,01
	5 h	PBS	0,274	0,01
	24 h	PBS	0,222	0,01
	48 h	PBS	0,205	0,04
	120 h	PBS	0,170	0,01
Rührstress (120 U/min; 500 µl; 2 ml Vial; RT)	Start	Marktform.	0,127	0,00
	5 h	Marktform.	0,128	0,00
	24 h	Marktform.	0,125	0,01
	48 h	Marktform.	0,129	0,04
	120 h	Marktform.	0,181	0,06
	Start	PBS	0,247	0,04
	5 h	PBS	0,224	0,03
	24 h	PBS	0,134	0,01
	48 h	PBS	0,127	0,01
	120 h	PBS	1,497	2,46
Rührstress (120 U/min; 500 µl; 2 ml Vial; KS)	Start	Marktform.	0,118	0,01
	5 h	Marktform.	0,115	0,02
	24 h	Marktform.	0,135	0,00
	48 h	Marktform.	0,175	0,02
	120 h	Marktform.	0,227	0,12
	Start	PBS	0,221	0,01
	5 h	PBS	0,232	0,01
	24 h	PBS	0,204	0,02
	48 h	PBS	0,239	0,04
	120 h	PBS	0,190	0,17




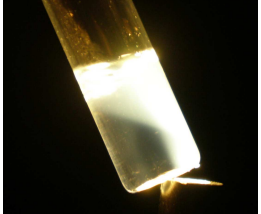

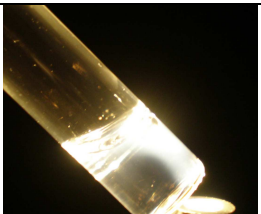
A5 Ausgewählte SDS-PAGE-Ergebnisse

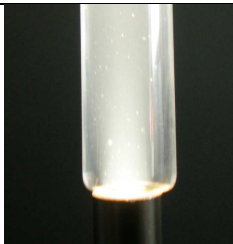



Tabelle A.5 Prozentangaben des Monomers und der leichten und schweren Kette nach DTT-Behandlung sind in der Tabelle dargestellt. Die Ergebnisse sind aus den Schüttelstressversuchen bei unterschiedlichen Temperaturen (Kap. 4.1.2) Fehlende Prozentanteile wurden als Aggregate und Degradationsprodukte detektiert.

Probe	Marktform./ PBS	Monomer [%]	+/-	Leichte Kette [%]	+/-	Schwere Kette [%]	+/-
Start	PBS	91,57	0,15	29,67	0,12	68,63	0,31
24 h geschüttelt bei 4°C	PBS	91,30	0,00	29,93	0,91	68,43	0,90
120 h geschüttelt bei 4°C	PBS	91,90	0,35	30,47	0,55	67,43	0,42
24 h ungeschüttelt bei 4°C	PBS	91,60	0,26	28,87	0,32	69,43	0,42
120 h ungeschüttelt bei 4°C	PBS	90,87	0,50	30,27	0,49	67,93	0,49
Start	Marktform.	92,63	0,31	28,70	0,17	69,50	0,40
24 h geschüttelt bei 4°C	Marktform.	93,00	0,53	28,73	0,78	69,47	0,78
120 h geschüttelt bei 4°C	Marktform.	93,13	0,32	29,10	0,36	69,40	0,36
24 h ungeschüttelt bei 4°C	Marktform.	92,53	0,50	27,87	0,42	70,23	0,49
120 h ungeschüttelt bei 4°C	Marktform.	93,07	0,12	29,20	0,17	69,33	0,21
Start	PBS	92,63	0,06	31,13	0,29	67,10	0,26
24 h geschüttelt bei 25°C	PBS	92,53	0,21	29,83	0,21	68,77	0,38
120 h geschüttelt bei 25°C	PBS	92,23	0,25	29,10	0,79	68,90	0,96
24 h ungeschüttelt bei 25°C	PBS	92,50	0,20	30,70	0,36	67,37	0,50
120 h ungeschüttelt bei 25°C	PBS	90,93	0,21	28,87	0,32	68,77	0,55
Start	Marktform.	93,53	0,47	29,90	1,14	67,80	1,48
24 h geschüttelt bei 25°C	Marktform.	93,70	0,17	30,13	0,49	67,53	0,50
120 h geschüttelt bei 25°C	Marktform.	93,43	0,23	30,20	0,53	68,20	0,61
24 h ungeschüttelt bei 25°C	Marktform.	93,70	0,17	30,17	0,12	67,27	0,25
120 h ungeschüttelt bei 25°C	Marktform.	93,40	0,10	29,90	1,28	68,70	1,31
Start	PBS	91,97	0,38	30,80	0,35	67,17	0,46
24 h geschüttelt bei 40°C	PBS	91,93	0,21	29,87	0,93	67,07	0,99
120 h geschüttelt bei 40°C	PBS	91,27	0,71	30,30	0,36	67,30	0,50
24 h ungeschüttelt bei 40°C	PBS	92,50	0,20	30,70	0,36	67,37	0,50
120 h ungeschüttelt bei 40°C	PBS	90,73	0,35	30,53	0,40	67,13	0,38
Start	Marktform.	93,13	0,15	30,53	0,15	67,83	0,15
24 h geschüttelt bei 40°C	Marktform.	92,93	0,15	29,73	0,31	67,67	0,06
120 h geschüttelt bei 40°C	Marktform.	93,07	0,72	30,20	0,53	68,20	0,61
24 h ungeschüttelt bei 40°C	Marktform.	93,40	0,46	29,63	0,49	67,80	0,75
120 h ungeschüttelt bei 40°C	Marktform.	92,93	0,31	29,90	1,28	68,70	1,31

A6 Ausgewählte Bilder der visuellen Kontrolle

Tabelle A.6 Die Proben (PBS-gepuffertes Cetuximab, pH 7,2) wurden nach dem Aufkonzentrierungsprozess in Glas-Vials abgefüllt und unter einer Kaltlichtquelle auf Präzipitate untersucht und fotografiert.

Aufkonzentrierungstechnik	Konzentration	Foto
Mit TFF ausgehend von 2 mg/ml aufkonzentriert (in diesem Fall auf 10 mg/ml aufkonzentriert und dann auf 1 mg/ml verdünnt; für statistisches Versuchsdesign verwendet; Kap. 3.2)	1 mg/ml	
Mit TFF ausgehend von 2 mg/ml aufkonzentriert (regenerierte Zellulose; 30 kD; für statistisches Versuchsdesign verwendet; Kap. 3.2)	50 mg/ml	
Mit TFF ausgehend von 2 mg/ml aufkonzentriert (regenerierte Zellulose; 30 kD; für statistisches Versuchsdesign verwendet; Kap. 3.2)	100 mg/ml	
Mit Zentrifugalkonzentratoren ausgehend von 10 mg/ml aufkonzentriert (regenerierte Zellulose; 10 kD ; Versuch verschiedener Ausschlussgrenzen; Kap. 3.3)	105 mg/ml	
Mit Zentrifugalkonzentratoren ausgehend von 10 mg/ml aufkonzentriert (regenerierte Zellulose; 30 kD ; Versuch verschiedener Ausschlussgrenzen; Kap. 3.3)	105 mg/ml	
Mit Zentrifugalkonzentratoren ausgehend von 10 mg/ml aufkonzentriert (regenerierte Zellulose; 100 kD; Versuch verschiedener Ausschlussgrenzen; Kap. 3.3)	105 mg/ml	

Mit Rührzelle ausgehend von 10 mg/ml aufkonzentriert (regenerierte Zellulose; 30 kD; Machbarkeitsstudie Aufkonzentrierung; Kap. 3.3)	147 mg/ml	
Mit Zentrifugalkonzentratoren ausgehend von 10 mg/ml aufkonzentriert (regenerierte Zellulose; 30 kD; Machbarkeitsstudie Aufkonzentrierung; Kap. 3.3)	167 mg/ml	
Mit TFF ausgehend von 10 mg/ml aufkonzentriert (regenerierte Zellulose; 30 kD; Machbarkeitsstudie Aufkonzentrierung; Kap. 3.3)	116 mg/ml	
Mit Dialyse ausgehend von 10 mg/ml aufkonzentriert (regenerierte Zellulose; 10 kD; Machbarkeitsstudie Aufkonzentrierung; Kap. 3.3)	175 mg/ml	

A7 Statistische Versuchsplanung

Tabelle A.7 Versuchsplan nach Cornerstone® mit detektierter Zielgröße (AUC des Monomergehaltes; mittels SEC bestimmt)

Ver- suchs- nr.	Füll- menge [ml]	Konzen- tration [mg/ml]	Zeit [h]	Schüttel- intensität [U/min]	Tween [%]	Monomergehalt (SEC) [AUC]
1	3,0	1	120	150	0	25109182
2	0,5	100	120	150	0	26292630
3	3,0	100	0	150	0	25773972
4	3,0	1	0	150	0,05	26732081
5	0,5	100	0	150	0,05	25382674
6	3,0	100	120	150	0,05	26078801
7	0,5	1	120	150	0,05	25388230
8	0,5	1	0	150	0	24802396
9	3,0	50	48	200	0	25417481
10	2,2	100	0	200	0,05	25382674
11	1,3	50	120	200	0,05	25723438
12	2,2	100	120	200	0	24315481
13	2,2	50	120	250	0,05	22221439
14	1,3	1	120	250	0	224546
15	0,5	1	0	250	0,05	26732081
16	3,0	100	48	250	0,05	24293882
17	1,3	100	0	250	0	25773972
18	0,5	1	120	300	0	2186
19	3,0	100	0	300	0,05	25382674
20	1,3	1	48	300	0,05	25773091
21	0,5	100	120	300	0,05	26087837
22	3,0	1	120	300	0,05	25524691
23	0,5	100	0	300	0	25773972
24	1,3	50	0	300	0,05	25983056
25	3,0	100	120	300	0	26206387
26	3,0	1	0	300	0	24802396
27	2,2	100	48	300	0	25977073

A8 Vergleich von Aufkonzentrierungstechniken

Tabelle A.8 Ergebnisse der Machbarkeitsstudie

	Start- volumen [ml]	End- volumen [ml]	Aufkon- zentra- tionsfak- tor	Wieder- findung [%] ^a	Zeit [min]	End- konzentration [mg/ml]	Trübung 350 nm [Abs]	SEC (Agg.) [%]	SDS- PAGE [%]	Kosten [€] ^b	Handling
Rührzelle	50	2,5	20	84,4	240	146	0,406	0,58	89,5	20	sehr gut
	50	2,3	22	74,5	240	147	0,815	0,50	89,8	20	sehr gut
	50	2,15	23	77,5	240	150	0,698	0,53	89,1	20	sehr gut
Dialyse	30	0,03	1000 ^c	6,6	2580	113	0,352	0,46	89,9	15	schlecht
	30	0,2	150	19,2	2580	175	0,484	0,47	91,3	15	schlecht
	30	0,3	100	11,1	2580	170	0,198	0,53	89,2	15	schlecht
TFF	200	12,8	16	72,2	60	116	0,314	0,37	89,2	269	gut
	200	13,8	15	71,7	55	115	0,313	0,40	89,6	269	gut
	200	13,8	15	78,6	60	124	0,360	0,36	89,3	269	gut
Zentrifugation	15	0,32	47	82,5	150	169	0,234	0,32	90	10	sehr gut
	15	0,30	50	81,8	150	167	0,227	0,42	89	10	sehr gut
	15	0,37	41	84,8	150	160	0,196	0,35	88,9	10	sehr gut

^a Wiederfindung an Protein in mg verglichen zu der Ausgangsmenge (auch Entnahmen zwischendurch wurden mit eingerechnet)

^b Kosten für eine Membran (Rührzellenmembran = 20,-€; Dialysekassette = 15,- €; TFF-Kassette = 269,- € Zentrifugalkonzentrator = 10,- €; Membranen von TFF und Rührzelle können gereinigt und erneut verwendet werden)

^c Wahrscheinlich Loch in der Dialysemembran

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Annette Regine Eppler
Geburtsdatum: 13. Februar 1981 in Tübingen
Status: ledig

Ausbildung

Seit 11/2010 **Roche Diagnostics GmbH Mannheim**
Quality Compliance Manager

04/2007 – 06/2010 **Merck Serono, Darmstadt**
Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter
Prof. Dr. H. Bunjes, Pharmazeutische Technologie, TU Braunschweig
Dr. M. Weigandt, Director Exploratory Development, NCE & NBE,
Merck Serono, Darmstadt

12/2006 **3. Staatsexamen**
Approbation als Apotheker
Gesamtnote: Gut

05/2006 - 10/2006 **Merck KGaA, Darmstadt**
Praktikant im praktischen Jahr gemäß Approbationsordnung

11/2005 - 04/2006 **Gartenfeld Apotheke, Mainz**
Praktikant im praktischen Jahr gemäß Approbationsordnung

10/2000 - 09/2005 **Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz**
Grund- und Hauptstudium Pharmazie
Note 2. Staatsexamen: Sehr gut

08/1997 - 07/2000 **Gymnasiale Oberstufe Goethe-Schule, Wetzlar**
Leistungskurs: Biologie, Geschichte

07/1991 - 07/1997 **Gesamtschule Rechtenbach, Hüttenberg**

Studienvorbereitende und -begleitende Tätigkeiten

03/2004 **Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz**
Praktikum
Arbeitskreis Prof. Dannhardt, Pharmazeutische Chemie
Biochemische Untersuchungsmethoden einschließlich Klinische Chemie

02/2002 **Zentralapotheke der Lahn-Dill-Kliniken, Wetzlar**
Famulatur

02/2002 **Sternapotheke, Rechtenbach**
Famulatur

09/2000 - 10/2000 **Caritas-Kindergartenstädte, Wetzlar**
Soziales Jahr
Begin eines sozialen Jahres, Abbruch aufgrund eines Studienplatzangebotes